



(51) МПК
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
C07K 14/505 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006127554/15, 22.12.2004

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.12.2004

(30) Конвенционный приоритет:
31.12.2003 US 60/533,858

(43) Дата публикации заявки: 10.02.2008

(45) Опубликовано: 20.10.2009 Бюл. № 29

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 01/81405 A, 01.11.2001. EGRIE J.C.

BROWNE J.K. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). British J. of Cancer, 2001, v.84, pp 3-10. CHAMOW S.M., ASHKENAZI A. Immunoadhesins: principles and applications. Trends Biotechnol. 1996 Feb; 14(2), pp.52-60.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 31.07.2006

(86) Заявка РСТ:
EP 2004/014608 (22.12.2004)

(87) Публикация РСТ:
WO 2005/063808 (14.07.2005)

Адрес для переписки:
101000, Москва, М.Златоустинский пер., 10,
кв.15, "ЕВРОМАРКПАТ", пат.пов.
Н.В.Кузенковой

(54) Fc-ЭРИТРОПОЭТИН СЛИТЫЙ БЕЛОК С УЛУЧШЕННОЙ ФАРМАКОКИНЕТИКОЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и касается Fc-эрритропоэтин слитого белка с улучшенной фармакокинетикой. Сущность изобретения включает новые сиалированные Fc-EPO слитые белки, предпочтительно включающие пару модификаций в Fc-части, а также в EPO части, которые имеют улучшенную фармакокинетику. В частности, Fc-EPO белки

(72) Автор(ы):

ДЖИЛИС Стивен Д. (US),
ЛОДЕР Скотт (US),
КРЕСС Дороте (DE),
МАЛЕР Ханс-Кристиан (DE),
МЮЛЛЕР Роберт (DE)

(73) Патентообладатель(и):
МЕРК ПАТЕНТ ГМБХ (DE)

R U 2 3 7 0 2 7 6 C 2

R U 2 3 7 0 2 7 6 C 2

обладают длительным периодом полураспада в сыворотке крови и повышенной эффективностью *in vivo*. Fc-EPO слитые белки, синтезированные в клетках ВНК, обладают значительно более продолжительными периодами полураспада в сыворотке крови и повышенной эффективностью *in vivo* по сравнению с соответствующими Fc-EPO слитыми белками, полученными в других линиях клеток, таких как, например,

клетки NS/0. Преимущество изобретения заключается в улучшении

фармакокинетических свойств эритропоэтина. 8 н. и 15 з.п. ф-лы, 6 табл., 11 ил.

R U 2 3 7 0 2 7 6 C 2

R U 2 3 7 0 2 7 6 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 2006127554/15, 22.12.2004

(24) Effective date for property rights:
22.12.2004

(30) Priority:
31.12.2003 US 60/533,858

(43) Application published: 10.02.2008

(45) Date of publication: 20.10.2009 Bull. 29

(85) Commencement of national phase: 31.07.2006

(86) PCT application:
EP 2004/014608 (22.12.2004)

(87) PCT publication:
WO 2005/063808 (14.07.2005)

Mail address:
101000, Moskva, M.Zlatoustinskij per., 10, kv.15,
"EVROMARKPAT", pat.pov. N.V.Kuzenkovoj

(72) Inventor(s):

DZhILIS Stiven D. (US),
LODER Skott (US),
KRESS Dorote (DE),
MALER Khans-Kristian (DE),
MJULLER Robert (DE)

(73) Proprietor(s):

MERK PATENT GMBKh (DE)

RU 2370276 C2

(54) Fc-ERYTHROPOIETIN FUSED PROTEIN WITH IMPROVED PHARMACOKINETICS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention concerns medicine and Fc-erythropoietin fused protein with improved pharmacokinetics. Invention claims novel sialylated Fc-EPO fused proteins preferably including modification pair in Fc part, as well as in EPO part, showing improved pharmacokinetics. Particularly, Fc-EPO proteins have longer half-life

in blood serum and higher efficiency in vivo. Fc-EPO fused proteins synthesised in BHK cells show much longer half-life in blood serum and higher efficiency in vivo than similar Fc-EPO fused proteins obtained in other cell lines, such as NS/0 cells.

EFFECT: improved pharmacokinetic properties of erythropoietin.

23 cl, 14 ex, 6 tbl, 11 dwg

RU 2370276 C2

Текст описания приведен в факсимильном виде.

Область изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает новые, как правило, высоко
5 сиалированные слитые белки Fc-EPO с улучшенной фармакокинетикой. В
частности, Fc-EPO белки обладают длительным периодом полураспада в
10 сыворотке крови и повышенной эффективностью *in vivo*. Fc-EPO слитые белки,
синтезированные в клетках ВНК, обладают весьма продолжительным периодом
15 полураспада в сыворотке крови и повышенной эффективностью *in vivo* по
сравнению с соответствующими Fc-EPO слитыми белками, полученными из
других линий клеток, например, клеток NS/0. Настоящее изобретение также
было осуществлено несколько модификаций для того, чтобы получить
соответствующие молекулы с дополнительными улучшенными свойствами.

20

25

30

35

40

45

50

Предпосылки изобретения

Эритропоэтин представляет собой гликопротеиновый гормон, который необходим для созревания эритроидных клеток-предшественников до эритроцитов. Он вырабатывается в почках и является важным в регуляции 5 уровней красных клеток крови в кровообращении. Состояния, сопровождающиеся низкими уровнями тканевого кислорода, усиливают сигнал в 10 отношении продукции эритропоэтина, который, в свою очередь, стимулирует эритропоэз. Уровень эритропоэтина в кровообращении строго регулируется для 15 гарантии того факта, что красные клетки крови будут вырабатываться только в ответ на длительный дефицит кислорода. 70% эритропоэтина выводится из 20 кровяного русла с помощью опосредованного рецептором эндоцитоза. Когда эритропоэтин связывается с рецептором, комплекс поглощается с помощью эндоцитоза и разлагается, ограничивая, таким образом, величину сигнала. Оставшийся эритропоэтин выводится с помощью почечной фильтрации в мочу. В результате этого эритропоэтин имеет относительно короткий период 25 полураспада в сыворотке крови.

Существующий в природе эритропоэтин или рекомбинантный эритропоэтин, полученный в клетках млекопитающих, содержат три N-30 связанных и одну O-связанную цепи олигосахаридов. N-связанное гликозилирование происходит на аспарагиновых остатках, которые находятся в положениях 24, 38 и 83, в то время как O-связанное гликозилирование 35 происходит на остатке серина, который находится в положении 126 (Lai *и др.*, (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 3116; Broudy *и др.*, (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* 265: 329). Как было продемонстрировано, олигосахаридные цепи модифицируются с помощью терминальных остатков сиаловой кислоты. N-связанные цепи типично 40 содержат до четырех сиаловых кислот на цепь, а O-связанные цепи содержат до двух сиаловых кислот. Полипептид эритропоэтина может, таким образом, вмещать в общей сложности до 14 сиаловых кислот. Было показано, что углевод 45 является необходимым для секреции эритропоэтина из клеток, для повышения растворимости эритропоэтина и для *in vivo* биологической активности эритропоэтина (Dube *и др.*, (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 17516; DeLorme *и др.*, (1992) *Biochemistry* 31: 9871-9876).

Введение рекомбинантного человеческого эритропоэтина было 50 эффективным при лечении расстройств гематопоэза или гематопоэтической

недостаточности, таких, как, например, различные формы анемии, в том числе те, которые ассоциированы с почечной недостаточностью, ВИЧ инфекцией, потерей крови или хроническими заболеваниями. Эритропоэтин обычно вводится путем внутривенной инъекции. Поскольку эритропоэтин обладает коротким периодом полураспада в сыворотке крови, то для поддержания терапевтически эффективного уровня эритропоэтина в кровообращении требуются частые внутривенные инъекции. Фармацевтические композиции, содержащие существующий в природе или рекомбинантный эритропоэтин человека, обычно вводятся три раза в неделю в дозе приблизительно 25-100 единиц/кг. Такая форма эритропоэтиновой терапии, несмотря на то, что она весьма эффективна, является чрезвычайно дорогой, поскольку внутривенное введение часто делает необходимым визит к врачу или в госпиталь. В настоящее время гипергликозилированный рекомбинантный аналог человеческого эритропоэтина, новый белок, стимулирующий эритропоэз (NESP), является доступным под торговым наименованием Aranesp® (Amgen Inc., Thousand Oaks, California) для лечения анемии. Aranesp® может вводиться не так часто, как нормальный эритропоэтин, для получения такого же биологического ответа.

Альтернативный путь введения представляет собой подкожную инъекцию. Эта форма введения может быть осуществлена пациентами на дому и является более совместимой с композициями медленного высвобождения, которые предлагают более медленную абсорбцию из места введения, обеспечивая, таким образом, эффект замедленного высвобождения. Однако с помощью подкожной инъекции достигаются значительно более низкие уровни в кровообращении и, таким образом, для достижения желаемого терапевтического эффекта необходимы частые инъекции. Кроме того, подкожное введение белковых лекарственных средств является более иммуногенным, чем внутривенное введение, поскольку кожа в качестве основного барьера для инфекции представляет собой иммунный орган, который является богатым на дендритные клетки и имеет механизмы чувствительности для идентификации и осуществления ответа на механическое повреждение поверхности и чужеродные материалы. Casadevall и др. недавно сделали сообщение, что пациенты, которые получают эритропоэтин подкожно, развивают выработку анти-эритропоэтиновых антител (Casadevall и др., (2002) *N Engl. J. Med.* 346(7): 469-75).

В соответствии с этим существует потребность в более эффективной эритропоэтиновой терапии, которая требует не таких частых введений.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает слитые белки эритропоэтина с улучшенной фармакокинетикой по сравнению (для различных воплощений) с диким типом эритропоэтина или природным эритропоэтином, с рекомбинантным эритропоэтином или с гипергликозилированным аналогом эритропоэтина NESP (публикация РСТ WO 00/24893). В соответствии с этим задачей настоящего изобретения является упрощение терапии с использованием эритропоэтина и снижение затрат, ассоциированных с лечением людей или других млекопитающих, страдающих расстройствами гематопоэза или гематопоэтической недостаточностью, или в соответствии с другими показаниями для введения.

В частности, настоящее изобретение обеспечивает биологически активный Fc-эритропоэтин (Fc-EPO) слитый белок, который обладает длительным периодом полураспада в сыворотке крови и повышенной эффективностью *in vivo*.

«Fc-EPO слитый белок», как используется в данной заявке, относится к белку, который включает полипептид, содержащий Fc часть и эритропоэтиновую часть. «Fc часть», как используется в данной заявке, охватывает домены, имеющие происхождение от константного участка иммуноглобулина, предпочтительно иммуноглобулина человека, в том числе фрагмента, аналога, варианта, мутанта или производной константного участка. «Эритропоэтиновая часть», как используется в данной заявке, охватывает эритропоэтин дикого типа или существующий в природе эритропоэтин человека или других видов, рекомбинантный эритропоэтин, а также эритропоэтинподобные молекулы, в том числе биологически активные фрагменты эритропоэтина, аналоги, варианты, мутанты или производные эритропоэтина.

В одном своем аспекте настоящее изобретением обеспечивает белки Fc-EPO, синтезированные в клетках ВНК. Fc-EPO слитые белки в соответствии с изобретением, синтезированные в клетках ВНК, продемонстрировали значительно увеличенные периоды полураспада в сыворотке крови и повышенную эффективность *in vivo* по сравнению с соответствующими Fc-EPO слитыми белками, полученными в других линиях клеток, таких как, например,

NS/0, PerC6, или 293 клетки. Настоящее изобретение также обеспечивает популяцию высоко сиалинированных Fc-ЕРО слитых белков, приемлемых для введения млекопитающему. Высоко сиалинированные Fc-ЕРО слитые белки обладают более продолжительным периодом полураспада в сыворотке крови и повышенной эффективностью *in vivo* по сравнению с эритропоэтином дикого типа или существующим в природе эритропоэтином, с рекомбинантным эритропоэтином, с гипергликозилированным аналогом эритропоэтина NESP или с Fc-ЕРО слитыми белками, обладающими той же аминокислотной последовательностью, синтезированными в клетках NS/0, PerC6 или 293. В соответствии с настоящим изобретением Fc-ЕРО слитый белок может содержать аминокислотные модификации в Fc части, которые обычно удлиняют период полураспада в сыворотке крови Fc слитого белка. Например, такие модификации аминокислот включают мутации, которые существенно снижают или устраняют связывание с Fc рецептором или активности в отношении фиксации комплемента. В дополнение к этому, Fc-ЕРО слитый белок может также содержать аминокислотные модификации в эритропоэтиновой части, которые снижают уровень эндоцитоза, опосредованного ЕРО рецептором, или повышают биологическую активность эритропоэтина. В различных воплощениях настоящее изобретение объединяет преимущества, которые обеспечиваются иммуноглобулиновым слитым белком, аминокислотными модификациями Fc части и эритропоэтиновой части, а также продукцией в клетках ВНК (например, высокие уровни сиалинирования). Объединенные преимущества имеют аддитивный или синергетический эффекты, которые приводят к получению Fc-ЕРО слитого белка с неожиданно длительным периодом полураспада в сыворотке крови и повышенной эффективностью *in vivo*.

В соответствии с этим настоящее изобретение в одном аспекте относится к клетке ВНК, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fc-ЕРО слитый белок. В одном воплощении ВНК клетка в соответствии с настоящим изобретением адаптируется для роста в среде, не содержащей белка. В другом воплощении ВНК клетка адаптируется для роста в супензии. Еще в одном воплощении ВНК клетка адаптируется для роста в среде, не содержащей белка, и в супензии. Было обнаружено, что Fc-ЕРО слитые белки, полученные из ВНК клеток, выращенных на среде, не содержащей белка, демонстрируют неожиданно усиленное и гомогенное сиалинирование по

сравнению с Fc-ЕРО слитыми белками, полученными из ВНК клеток, выращенных на другой среде. В предпочтительном воплощении нуклеиновая кислота стабильно поддерживается в клетке ВНК. Выражение «стабильно поддерживаемая нуклеиновая кислота», как используется в данной заявке, относится к любой нуклеиновой кислоте, скорость потери которой от материнской до дочерней клетки является меньшей, чем три процента при отсутствии селективного давления, такого, как отбор на основе антибиотика, для поддержания нуклеиновой кислоты. Таким образом, когда клетки стабильно поддерживают деления нуклеиновой кислоты, то, по крайней мере, 97% (а более предпочтительно, более, чем 98, более, чем 99, или более, чем 99,5%) полученных клеток содержат нуклеиновую кислоту. Когда полученные клетки содержат поделенную нуклеиновую кислоту, по крайней мере, 97% клеток, полученных в результате такого (второго) деления будут содержать эту нуклеиновую кислоту. Кроме того, количество копий нуклеиновой кислоты на клетку не является существенно сниженным при повторном клеточном делении.

В предпочтительном воплощении стабильно поддерживаемая последовательность нуклеиновой кислоты является интегрированной в геном ВНК клетки.

Последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать Fc-ЕРО слитый белок в любой из различных его конфигураций. В предпочтительном воплощении последовательность нуклеиновой кислоты кодирует Fc-ЕРО слитый белок, который включает Fc часть на N-терминальном конце Fc-ЕРО слитого белка, и эритропоэтиновую часть на С-терминальном конце Fc-ЕРО слитого белка. Fc часть обычно охватывает участки, которые имеют происхождение от константного участка иммуноглобулина, включая фрагмент, аналог, вариант, мутант или производную константного участка. В предпочтительных воплощениях Fc часть имеет происхождение от тяжелой цепи иммуноглобулина человека, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или других классов. В некоторых воплощениях Fc-ЕРО слитый белок не включает вариабельного участка иммуноглобулина. В одном воплощении Fc часть включает СН2 домен. В другом воплощении Fc часть включает СН2 и СН3 домены.

В предпочтительном воплощении Fc часть содержит мутацию, которая снижает аффинность для Fc рецептора или снижает эффекторную функцию Fc. Например, Fc часть может содержать мутацию, которая устраняет сайт

гликозилирования в пределах Fc части тяжелой цепи IgG. В некоторых воплощениях Fc часть содержит мутации, делеции или инсерции в аминокислотных положениях, соответствующих Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Asn297 или Pro331 IgG1 (аминокислоты пронумерованы в соответствии с EU номенклатурой). В предпочтительном воплощении Fc часть содержит мутацию в аминокислотном положении, соответствующем Asn297 IgG1. В альтернативных воплощениях Fc часть содержит мутаций, делеции или инсерции в аминокислотных положениях, соответствующих Leu281, Leu282, Gly283, Gly284, Asn344 или Pro378 IgG1.

В некоторых воплощениях Fc часть содержит CH2 домен, имеющий происхождение от тяжелой цепи IgG2 или IgG4 человека. Является предпочтительным, когда CH2 домен содержит мутацию, которая устраниет сайт гликозилирования в пределах CH2 домена. В одном воплощении мутация изменяет аспарагин в пределах аминокислотной последовательности Gln-Phe-Asn-Ser внутри CH2 домена тяжелой цепи IgG2 или IgG4. Предпочтительно, когда мутация изменяет аспарагин на глутамин. Альтернативно, мутация изменяет как фенилаланин, так и аспарагин, в пределах аминокислотной последовательности Gln-Phe-Asn-Ser. В одном воплощении аминокислотная последовательность Gln-Phe-Asn-Ser заменяется аминокислотной последовательностью Gln-Ala-Gln-Ser.

Аспарагин в пределах аминокислотной последовательности Gln-Phe-Asn-Ser соответствует Asn297 IgG1. Было обнаружено, что мутация аспарагина в пределах аминокислотной последовательности Gln-Phe-Asn-Ser IgG2 или IgG4 (т.е. соответствует Asn297 IgG1) также неожиданно снижает связывание Fc-EPO слитого белка с рецептором EPO. Не желая ограничиваться теорией, следует сказать, что мутация аспарагина в пределах аминокислотной последовательности Gln-Phe-Asn-Ser IgG2 или IgG4 (т.е. соответствует Asn297 IgG1) может индуцировать общее конформационное изменение в Fc-EPO слитом белке, что ведет к значительному улучшению фармакокинетических свойств.

В другом воплощении Fc часть включает CH2 домен и, по крайней мере, часть шарнирного участка. Шарнирный участок может иметь происхождение от тяжелой цепи иммуноглобулина, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или других классов. Предпочтительно, когда шарнирный участок имеет происхождение от IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или других приемлемых классов. Более предпочтительно,

когда шарнирный участок имеет происхождение от тяжелой цепи IgG1 человека. В одном воплощении цистеин в аминокислотной последовательности Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Lys IgG1 шарнирного участка является измененным. В 5 предпочтительном воплощении аминокислотная последовательность Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Lys заменяется аминокислотной последовательностью Pro-Lys-Ser-Ser-Asp-Lys. В одном воплощении Fc часть включает CH2 домен, полученный из 10 первого изотипа антитела, и шарнирный участок, полученный из второго изотипа антитела. В специфическом воплощении CH2 домен имеет 15 происхождение от тяжелой цепи IgG2 или IgG4 человека, в то время как шарнирный участок имеет происхождение от измененной тяжелой цепи IgG1 человека.

В предпочтительном воплощении Fc часть имеет происхождение от 20 последовательности IgG, в которой аминокислотная последовательность Leu-Ser-Leu-Ser поблизости С-терминального конца константного участка изменена для устранения потенциальных соединительных эпитопов Т-клеток. Например, в 25 одном воплощении аминокислотная последовательность Leu-Ser-Leu-Ser заменена на аминокислотную последовательность Ala-Thr-Ala-Thr. В другом воплощении Fc часть имеет происхождение от последовательности IgG, в 30 которой С-терминальный остаток лизина является заменным. Предпочтительно, когда С-терминальный лизин последовательности IgG является заменным аминокислотой, отличной от лизина, такой как аланин, для 35 дальнейшего повышения периода полураспада в сыворотке крови Fc слитого белка.

В соответствии с настоящим изобретением Fc часть может содержать одну 40 или более мутаций, описанных в данной заявке. Комбинации мутаций в Fc части обычно имеют аддитивный или синергетический эффект в отношении длительного периода полураспада в сыворотке крови и повышенной *in vivo* 45 эффективности Fc-ЕРО слитого белка. Таким образом, в одном воплощении Fc часть может содержать (i) участок, имеющий происхождение от последовательности IgG, в которой аминокислотная последовательность Lys-Ser-Lys-Ser заменена аминокислотной последовательностью Ala-Thr-Ala-Thr; (ii) С- 50 терминальный остаток аланина содержится вместо лизина; (iii) CH2 домен и шарнирный участок, которые имеют происхождение от различных изотипов антител, например, CH2 домена IgG2 и измененного шарнирного участка IgG1;

(iv) мутацию, которая устраниет сайт гликозилирования в пределах CH2 домена, имеющего происхождение от IgG2, например, аминокислотная последовательность Gln-Ala-Gln-Ser содержится вместо аминокислотной последовательности Gln-Phe-Asn-Ser в пределах CH2 домена, имеющего происхождение от IgG2.

Эритропоэтиновая часть Fc-EPO слитого белка может представлять собой таковую полной длины эритропоэтина дикого типа или существующего в природе эритропоэтина, рекомбинантного эритропоэтина или эритропоэтинподобной молекулы, такой как биологически активный фрагмент эритропоэтина, аналог, вариант, мутант или производная эритропоэтина. Предпочтительно, когда эритропоэтиновая часть имеет происхождение от эритропоэтина человека. В некоторых воплощениях эритропоэтиновая часть может содержать модификации аминокислот, которые снижают связывающую аффинность для рецептора EPO или повышают биологическую активность эритропоэтина. В некоторых воплощениях эритропоэтиновая часть содержит, по крайней мере, одну из следующих мутаций: Arg131 → Glu и Arg139 → Glu (нумерация аминокислот на основе последовательности зрелого эритропоэтина человека). В других воплощениях эритропоэтиновая часть содержит, по крайней мере, одну из следующих мутаций: His₃₂ → Gly, Ser₃₄ → Arg, и Pro₉₀ → Ala. Еще в другом воплощении эритропоэтиновая часть имеет модель дисульфидного связывания, которая отличается от таковой эритропоэтина человека. Например, эритропоэтиновая часть может содержать одну или более следующих аминокислотных замен: остаток, отличный от цистеина, в положении 29, остаток, отличный от цистеина, в положении 33, остаток цистеина в положении 88 и остаток цистеина в положении 139. В одном воплощении эритропоэтиновая часть содержит цистeinовые остатки в положениях 7, 29, 88 и 161. В другом воплощении эритропоэтиновая часть в дополнение содержит одну или более следующих замен: His₃₂ → Gly, Cys₃₃ → Pro и Pro₉₀ → Ala. В соответствии с настоящим изобретением эритропоэтиновая часть может содержать любую комбинацию мутаций, описанных в данной заявке.

В некоторых воплощениях Fc-EPO слитый белок включает линкер между Fc частью и эритропоэтиновой частью. Если слитый белок содержит линкер, то он размещается между 1 и 25 аминокислотами и предпочтительно не содержит

сайта расщепления для протеазы. Линкер может содержать N-связанный или O-связанный сайт гликозилирования для блокирования протеолиза. Например, в одном воплощении линкер содержит аминокислотную последовательность Asn-Ala-Thr.

Настоящее изобретение также относится к способу получения Fc-ЕРО слитого белка. Способ включает поддержание ВНК клеток, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fc-ЕРО слитый белок, в условиях, приемлемых для экспрессии кодируемого Fc-ЕРО слитого белка, и восстановление Fc-ЕРО слитого белка. В одном воплощении ВНК клетки культивируют в среде, не содержащей белка. В другом воплощении ВНК клетки культивируют в супензии. Еще в одном воплощении ВНК клетки культивируют в среде, не содержащей белка, и в супензии. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота стабильно поддерживается в ВНК клетках. Обычно Fc-ЕРО слитый белок, вырабатываемый ВНК клетками, имеет более длительный период полураспада в сыворотке крови, чем соответствующий Fc-ЕРО слитый белок, вырабатываемый другими линиями клеток, такими как, например, NS/0, PerC6 или 293 клетки.

Настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую Fc-ЕРО слитый белок, вырабатываемый клетками ВНК. В предпочтительном воплощении Fc-ЕРО слитый белок, используемый в фармацевтической композиции, не подвергается обработке для удаления остатков сиаловой кислоты. Фармацевтическая композиция также включает фармацевтически приемлемый носитель. Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения млекопитающего путем введения фармацевтической композиции млекопитающему. В некоторых воплощениях подвергаемое лечению млекопитающее имеет расстройство гематопоэза или гематопоетическую недостаточность. Поскольку Fc-ЕРО слитые белки в соответствии с настоящим изобретением обладают повышенной *in vivo* эффективностью и длительным периодом полураспада в сыворотке крови, фармацевтические композиции, содержащие Fc-ЕРО слитые белки, обычно требуют менее частых введений по сравнению с фармацевтическими композициями, содержащими существующий в природе эритропоэтин или рекомбинантный эритропоэтин, или соответствующими Fc-ЕРО слитыми белками, полученными в других клетках. В предпочтительном воплощении

фармацевтическая композиция вводится менее трех раз в неделю (например, два раза в неделю, один раз в неделю или не чаще одного раза каждые десять дней, например, один раз в две недели, один раз в месяц или один раз в два месяца).

5 В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ отбора ВНК клетки, которая стабильно поддерживает нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, включающий Fc часть и эритропоэтиновую часть. Способ включает введение в ВНК клетку последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей гигромицин В, и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок; а также культивирование ВНК клетки в присутствии 10 гигромицина В. В одном воплощении последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей гигромицин В, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок; а также культивирование ВНК клетки в присутствии 15 гигромицина В. В одном воплощении последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей гигромицин В, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, присутствуют в одной и той же нуклеиновой 20 кислоте. В другом воплощении последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая гигромицин В, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, присутствуют в двух различных нуклеиновых 25 кислотах.

25 В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает популяцию очищенных Fc-ЕРО слитых белков, приемлемых для введения млекопитающему. В предпочтительном воплощении Fc-ЕРО слитые белки включают Fc часть на N- 30 терминальном конце Fc-ЕРО слитых белков и эритропоэтиновую часть на C-терминальном конце Fc-ЕРО слитых белков. В более предпочтительном воплощении популяция Fc-ЕРО слитых белков является высоко 35 сиалинированной, то есть содержит в среднем 11-28 остатков сиаловой кислоты на очищенный Fc-ЕРО слитый белок. Предпочтительно высоко сиалинированные популяции Fc-ЕРО слитых белков содержат в среднем 13-28, 15-28, 17-28, 19-28 или 21-28 остатков сиаловой кислоты на очищенный Fc-ЕРО слитый белок. 40 Например, одна предпочтительная высоко сиалинированная популяция Fc-ЕРО слитых белков содержит в среднем от 20 до 22 остатков сиаловой кислоты на очищенный Fc-ЕРО слитый белок. В предпочтительном воплощении очищенные 45 Fc-ЕРО слитые белки синтезируются в ВНК клетке. В одном воплощении ВНК клетка является адаптированной для роста в супензии. В другом воплощении ВНК клетка адаптируется для роста в среде, не содержащей белка. Еще в одном 50 воплощении ВНК клетка адаптируется для роста среде, не содержащей белка, и в супензии. Высоко сиалинированная популяция очищенных Fc-ЕРО слитых

белков, которая обеспечивается в соответствии с настоящим изобретением, имеет более длительный период полураспада в сыворотке крови по сравнению с популяцией соответствующих Fc-EPO слитых белков, полученных в таких клетках, как, например, клетки NS/0, PerC6 или 293. В соответствии с настоящим изобретением Fc часть и эритропоэтиновая часть очищенных Fc-EPO слитых белков может содержать одну или более мутаций или модификаций, как описано в данной заявке, которые обеспечивают более длительный период полураспада в сыворотке крови и повышенную активность *in vivo* с эффектами, которые являются аддитивными или синергетическими с повышенным сиалированием.

Настоящее изобретение также обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую высоко сиалированную популяцию очищенных Fc-EPO слитых белков, как описано в данной заявке. Предпочтительная фармацевтическая композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель. Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения млекопитающего, включающий введение млекопитающему фармацевтической композиции, содержащей высоко сиалированную популяцию очищенных Fc-EPO слитых белков. В предпочтительном воплощении фармацевтическая композиция вводится менее трех раз в неделю (например, два раза в неделю, один раз в неделю или не чаще одного раза каждые десять дней, например, один раз в две недели, один раз в месяц или один раз в два месяца).

Вкратце изобретение относится к следующим аспектам:

- Очищенному димерному слитому белку, который существенно включает димерную Fc часть молекулы IgG человека, содержащую шарнирный участок, CH2 и CH3 домены и эритропоэтин человека (EPO), где каждая цепь димерной Fc части является связанный посредством своего С-терминального конца непосредственно или с помощью линкерного полипептида с N-терминальным концом молекулы EPO, при этом указанный слитый белок обладает следующими свойствами:(i) молекула является высоко сиалированной путем включения 15-28 остатков сиаловой кислоты; (ii) CH2 домен имеет происхождение от IgG2 и является модифицированным посредством замены аминокислотных остатков Phe и Asn в пределах последовательности Gln-Phe-Asn-Ser CH2 домена на Ala и Asn, таким образом образуется последовательность Gln-Ala-Gln-Ser в пределах CH2

домена и (iii) аминокислотная последовательность Leu-Ser-Leu-Ser, которая находится на С-терминальном конце CH3 домена заменяется на Ala-Thr-Ala-Thr.

5 ▪ Соответствующему димерному Fc-EPO слитому белку, в котором дополнительно С-терминальный остаток Lys CH3 домена заменен Ala.

10 ▪ Соответствующему димерному Fc-EPO слитому белку, в котором шарнирный участок имеет происхождение от IgG1 человека.

15 ▪ Соответствующему димерному Fc-EPO слитому белку, в котором указанный шарнирный участок IgG1 является модифицированным путем замены аминокислотного остатка Cys в пределах последовательности Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Lys шарнирного участка остатком Ser, образуя, таким образом, последовательность Pro-Lys-Ser-Ser-Asp-Lys в пределах шарнирного участка.

20 ▪ Соответствующему димерному Fc-EPO слитому белку, в котором эритропоэтиновая часть включает, по крайней мере, одну из следующих аминокислотных замен:

- 25 (i) остаток, отличный от цистеина, в положении 29 молекулы EPO,
- (ii) остаток, отличный от цистеина, в положении 33 молекулы EPO,
- (iii) остаток цистеина в положении 88 молекулы EPO и
- (iv) остаток цистеина в положении 139 молекулы EPO.

30 ▪ Соответствующему димерному Fc-EPO слитому белку, в котором аминокислотный остаток, отличный от Cys, находится в положении 33 молекулы EPO вместо исходного остатка Cys, а остаток Cys находится в положении 88 молекулы EPO вместо исходного остатка Trp, что позволяет EPO части в 35 пределах слитого белка образовывать Cys₂₉ - Cys₈₈ дисульфидную связь.

40 ▪ Соответствующему димерному Fc-EPO слитому белку, в котором аминокислотный остаток, отличный от Cys, в положении 33 представляет собой Pro.

45 ▪ Соответствующему димерному Fc-EPO слитому белку, в котором EPO часть включает одну или более мутаций, выбранных из группы:

- (i) Arg₁₃₁ → Glu₁₃₁
- (ii) Arg₁₃₉ → Glu₁₃₉
- (iii) His₃₂ → Gly₃₂
- (iv) Ser₃₄ → Arg₃₄
- (v) Pro₉₀ → Ala₉₀.

- Соответствующему димерному Fc-ЕРО слитому белку, в котором линкерный пептид включает сайт гликозилирования.
- 5 ▪ Соответствующему димерному Fc-ЕРО слитому белку, в котором сайт гликозилирования включает аминокислотную последовательность Asn-Ala-Thr.
- 10 ▪ Соответствующему димерному Fc-ЕРО слитому белку, включающему дополнительно домен CH1.
- 15 ▪ Соответствующему Fc-ЕРО слитому белку, в котором полная молекула IgG, включающая домены CH2, CH3 и необязательно CH1, имеет происхождение от IgG2, а шарнирный участок имеет происхождение от IgG1.
- 20 ▪ Соответствующему Fc-ЕРО слитому белку, в котором полная молекула IgG, включающая домены CH2, CH3 и шарнирный участок и необязательно CH1, имеет происхождение от IgG1.
- 25 ▪ Соответствующему димерному Fc-ЕРО слитому белку, в котором слитый белок содержит 18 - 24, предпочтительно 20 - 22 остатков сиаловой кислоты.
- 30 ▪ Димерному Fc-ЕРО слитому белку, включающему последовательность:

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLPPPDKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDEPE
 25 VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQASTFRWSVLTWHQDWLNGKEYKCKVSN
 KGLPAPIEKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKMQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTPPMQLSDGSFPLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALH
 30 NHYTQKSATATPGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITV
 PDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQL
 HVDKAVSGLRSLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNF
 35 LRGKLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO: 14).

- 35 ▪ Димерному Fc-ЕРО слитому белку, включающему последовательность:

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPDKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDEPE
 40 VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQASTFRWSVLTWHQDWLNGKEYKCKVSN
 KGLPAPIEKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTPPMQLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALH
 NHYTQKSATATPGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEGPSLNENITV
 45 PDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVWSSQPCEALQ
 LHVDKAVSGLRSLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNF
 FLRGKLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO: 15).

- 50 ▪ Молекуле ДНК, кодирующей слитый белок, как указано выше.

• Фармацевтической композиции, приемлемой для лечения расстройств гематопоэза или гематопоэтических недостаточностей у млекопитающего, включающей эффективное количество Fc-EPO слитого белка, как указано выше или в пунктах формулы, необязательно вместе с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или наполнителем.

▪ Популяции очищенных высоко сиализированных Fc-EPO слитых белков, приемлемых для введения млекопитающему, при этом Fc-EPO слитые белки включают Fc часть на N-терминальном конце Fc-EPO слитых белков и эритропоэтиновую часть на C-терминальном конце Fc-EPO слитых белков, где указанная популяция слитых белков содержит в среднем 15-28 остатков сиаловой кислоты на очищенный Fc-EPO слитый белок и ее возможно получить путем введения молекулы ДНК, кодирующей соответствующий Fc-EPO слитый белок, в ВНК клетку, а также экспрессии и очистки популяции соответствующих Fc-EOP слитых белков, при этом популяция имеет более длительный период полураспада в сыворотке крови по сравнению с популяцией Fc-EPO слитых белков, синтезированных в NS/0, PerC6 или 293 клетках.

▪ Соответствующей популяции очищенных Fc-EPO слитых белков, где указанная популяция слитых белков содержит в среднем 20-22 остатков сиаловой кислоты на очищенный Fc-EPO слитый белок.

▪ Соответствующей популяции очищенных Fc-EPO слитых белков, где ВНК клетка адаптируется для роста в среде, не содержащей белка, или в супензии.

▪ Способу получения популяции высоко сиализированных очищенных рекомбинантных Fc-EPO слитых белков, включающих Fc часть на N-терминальном конце Fc-EPO слитых белков и эритропоэтиновую часть на C-терминальном конце Fc-EPO слитых белков, при этом указанный способ включает следующие этапы:

- (i) конструирование молекулы ДНК, кодирующей Fc-EPO слитый белок;
- (ii) трансформацию ВНК клетки с помощью указанной молекулы ДНК в среде, не содержащей белка, или в супензии;
- (iii) экспрессию популяции Fc-слитых белков, кодируемых указанной молекулой ДНК,
- (iv) сбор, изоляцию и очистку указанной популяции Fc-EPO слитых белков.

5 • Соответствующему способу, в котором указанная синтезированная популяция слитых белков содержит в среднем 15-28, предпочтительно 15-25, более предпочтительно 20-22 остатка сиаловой кислоты на очищенный Fc-EPO слитый белок.

10 • Способу отбора ВНК клетки, стабильно поддерживающей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fc-EPO слитый белок, включающий Fc часть и эритропоэтиновую часть, при этом способ включает этапы: (а) введение в ВНК клетку последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей гигромицин В, и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей Fc-EPO слитый белок; (б) культивирование ВНК клетки в 15 присутствии гигромицина В.

20 • Соответствующему способу, в котором последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая гигромицин В, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc-EPO слитый белок, представлены в одной молекуле ДНК.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

25 Фигуры 1А и 1В показывают выравнивание аминокислотных последовательностей константного участка IgG1, IgG2 и IgG4 человека.

30 Фигура 2 показывает фармакокинетический эксперимент у мышей, который отражает корреляцию между дозой Fc-EPO и величиной снижения концентраций Fc-EPO в сыворотке крови во время альфа фазы. В этом эксперименте использовали недостаточно сиалинированный вариант Fc-EPO, синтезированный 35 в клетках NS/0.

40 Фигура 3 показывает потенциальные пути элиминирования Fc-EPO слитых белков и модификаций слитого белка, которые потенциально модулируют эти пути.

45 Фигура 4 показывает пример ответов гематокрита у мышей после введения Fcg2h(FN > AQ)-EPO.

50 Фигура 5 показывает пример ответов гематокрита у крыс после введения Fcg2h-EPO, Fcg2h-EPO(NDS), Fcg4h-EPO и Fcg4h(N > Q)-EPO белков, полученных из клеток ВНК.

55 Фигура 6 показывает пример ответов гематокрита у мышей после введения Fcg2h-EPO(NDS), полученного из клеток ВНК, Fcg2h-EPO(NDS), полученного из клеток NS/0, и NESP (т.е. Aranesp®).

Фигура 7 показывает пример последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей зрелый белок Fc-EPO.

Фигура 8 показывает фармакокинетические профили Fcg2h(N > Q)-EPO, 5 полученного из клеток BHK, и Fcg2h(N > Q)-EPO, полученного из клеток NS/0, у мышей.

Фигура 9 показывает фармакокинетические профили Fcg2h-EPO(NDS), 10 полученного из клеток BHK, и Fcg2h-EPO(NDS), полученного из клеток NS/0, у мышей.

Фигура 10 показывает фармакокинетические профили белков Fcg2h-EPO(NDS), 15 полученных в клетках BHK-21, PerC6 и 293 клетках у мышей.

Фигура 11 показывает ответы гематокрита у гончих собак после лечения с помощью Fcg2h(FN → AQ)-EPO белков, синтезированных в клетках BHK.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает Fc-EPO слитый белок с улучшенной фармакокинетикой. В частности, Fc-EPO белок, обеспечиваемый настоящим изобретением, обладает длительным периодом полураспада в сыворотке крови и повышенной эффективностью *in vivo*. В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает Fc-EPO слитый белок, синтезированный в клетках BHK. Fc-EPO слитые белки, синтезированные в клетках BHK, продемонстрировали 20 чрезвычайно продолжительные периоды полураспада в сыворотке крови и повышенную эффективность *in vivo* при сравнении с соответствующими Fc-EPO слитыми белками, полученными в других линиях клеток, таких как, например, клетки NS/0, PerC6 или 293. В другом аспекте настоящее изобретение 25 обеспечивает популяцию высоко сиалированных Fc-EPO слитых белков. Популяция высоко сиалированных Fc-EPO слитых белков имеет более длительный период полураспада в сыворотке крови по сравнению с популяцией 30 соответствующих Fc-EPO слитых белков с более низкими уровнями сиалирования. В соответствии с настоящим изобретением Fc-EPO слитый белок может содержать аминокислотные модификации в Fc части, что 35 продлевает период полураспада в сыворотке крови Fc слитого белка, например, путем существенного снижения или устранения связывающей активности по 40 отношению к Fc рецептору, или модификаций, которые снижают активность в отношении фиксации комплемента. В дополнение, Fc-EPO слитый белок может 45 также содержать аминокислотные модификации в эритропоэтиновой части, что 50

снижает эндоцитоз, опосредованный рецептором EPO, увеличивает биологическую активность эритропоэтина.

Fc-EPO слитый белок

«Fc-EPO слитый белок», как используется в данной заявке, относится к белку, включающему полипептид, обладающий, по крайней мере, двумя частями, а именно Fc частью и эритропоэтиновой частью, которые в норме не содержаться в одном и том же полипептиде. В предпочтительных воплощениях настоящего изобретения полипептид, содержащий Fc часть и эритропоэтиновую часть, образует гомодимеры; в соответствии с этим Fc-EPO слитый белок в общем случае представляет собой димерный белок, который удерживается вместе с помощью одной или более дисульфидных связей, при этом каждая полипептидная цепь содержит Fc часть и эритропоэтиновую часть. Однако Fc-EPO слитый белок в соответствии с настоящим изобретением может иметь любую конфигурацию, позволяющую эритропоэтиновым частям стабильно ассоциироваться с Fc частью, поддерживая при этом эритропоэтиновую активность. Например, такие конфигурации включают, но не ограничены, 20 одиночный полипептид, содержащий две части Fc и две эритропоэтиновые части, одиночный полипептид, содержащий Fc части и одну эритропоэтиновую часть, гетеродимерный белок, включающий один полипептид, содержащий Fc 25 часть и эритропоэтиновую часть, и другой полипептид, содержащий Fc часть, а 30 также другие приемлемые конфигурации.

Эритропоэтиновая часть может непосредственно или опосредованно 35 соединяться с Fc частью в различных конфигурациях. В одном воплощении эритропоэтиновая часть непосредственно соединяется с Fc частью посредством ковалентной связи. Например, эритропоэтиновая часть может быть непосредственно присоединена к Fc части на своем C-терминальном конце или 40 на своем N-терминальном конце. В одном воплощении C-терминальный конец Fc части присоединен к N-терминальному концу эритропоэтиновой части, то есть $N_{term}\text{-}Fc\text{-}C_{term}\text{-}N_{term}\text{-}EPO\text{-}C_{term}$. В этой конфигурации Fc часть находится на 45 N-терминальном конце Fc-EPO слитого белка, а эритропоэтиновая часть находится на C-терминальном конце. В другом воплощении C-терминальный конец эритропоэтина является слитым с N-терминальным концом Fc части, то 50 есть $N_{term}\text{-}EPO\text{-}C_{term}\text{-}N_{term}\text{-}Fc\text{-}C_{term}$. В этой конфигурации эритропоэтиновая

часть находится на N-терминальном конце Fc-ЕРО слитого белка, а Fc часть находится на C-терминальном конце.

В других воплощениях эритропоэтиновая часть опосредовано соединена с Fc частью. Например, Fc-ЕРО слитый белок может включать линкер (L) между Fc частью и эритропоэтиновой частью. Подобно непосредственному слиянию эритропоэтиновая часть является предпочтительно слитой с C-терминальным концом Fc части посредством линкера, то есть $N_{term}\text{-Fc}\text{-}C_{term}\text{-}L\text{-}N_{term}\text{-EPO}\text{-}C_{term}$. Таким образом, Fc часть находится на N-терминальном конце Fc-ЕРО слитого белка и отделена линкером от эритропоэтиновой части на C-терминальном конце. Альтернативно, эритропоэтиновая часть может быть слита с N-терминальным концом Fc части посредством линкера, то есть $N_{term}\text{-EPO}\text{-}C_{term}\text{-}L\text{-}N_{term}\text{-Fc}\text{-}C_{term}$.

20 Fc часть

Как используется в данной заявке «Fc часть» охватывает домены, имеющие происхождение от константного участка иммуноглобулина, предпочтительно человеческого иммуноглобулина, включая фрагмент, аналог, вариант, мутант или производную константного участка. Приемлемые иммуноглобулины включают IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и другие классы. Константный участок иммуноглобулина определяется как существующий в природе и полученный синтетическим путем полипептид, гомологичный C-терминальному участку иммуноглобулина, он может включать CH1 домен, шарнир, CH2 домен, CH3 домен или CH4 домен, раздельно или в сочетании. Выравнивание последовательностей постоянных участков IgG1, IgG2 и IgG4 человека показано на Фигурах 1А и 1В. В соответствии с Paul, (1999) *Fundamental Immunology* 4-ое изд., Lippincott-Raven, CH1 домен включает аминокислоты 118 - 215; шарнирный участок включает аминокислоты 216 - 230; CH2 домен включает аминокислоты 231 - 340; а CH3 домен включает аминокислоты 341 - 447 (положения аминокислот на основе последовательности IgG1). Шарнирный участок соединяет CH1 домен с CH2 и CH3 доменами.

В настоящем изобретении Fc часть типично включает, по крайней мере, CH2 домен. Например, Fc часть может включать шарнир-CH2-CH3. Альтернативно, Fc часть может включать весь шарнирный участок или часть шарнирного участка, CH2 домен и/или CH3 домен.

Постоянный участок иммуноглобулина является ответственным за множество функций антитела, в том числе связывание с Fc рецептором (FcR) и фиксацию комплемента. Существует пять основных классов постоянного участка тяжелой цепи, которые классифицируются, как IgA, IgG, IgD, IgE, IgM, каждый из которых имеет характерные эффекторные функции, определяемые изотипом. Например, IgG разделяется на четыре подкласса: $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ и $\gamma 4$, 5 которые также известны как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, соответственно. 10

IgG молекулы взаимодействуют с многочисленными классами клеточных рецепторов, в том числе с тремя классами рецепторов Fc γ (Fc γ R), 15 специфическими для IgG класса антител, а именно Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Было продемонстрировано, что важные последовательности для связывания IgG с 20 рецепторами Fc γ R размещаются в CH2 и CH3 доменах. Период полураспада в сыворотке крови находится под влиянием способности, с которой антитело связывается с рецептором Fc (FcR). Подобно этому период полураспада в 25 сыворотке крови слитых белков также находится под влиянием способности связываться с такими рецепторами (Gillies SD *и др.*, (1999) *Cancer Res.* 59: 2159- 30 66). По сравнению с таковыми IgG1, CH2 и CH3 домены IgG2 и IgG4 обладают неопределенной биохимически или пониженной аффинностью связывания с 35 рецепторами Fc. Было продемонстрировано, что слитые белки иммуноглобулина, содержащие домены CH2 и CH3 IgG2 или IgG4 имеют более длительный период полураспада в сыворотке крови по сравнению с соответствующими слитыми 40 белками, содержащими CH2 и CH3 домены IgG1 (Патент США № 5541087; Lo *и др.*, (1998) *Protein Engineering*, 11: 495-500). В соответствии с этим 45 предпочтительные CH2 и CH3 домены для настоящего изобретения имеют происхождение от изотипа антитела со сниженной аффинностью связывания с 50 рецептором и эффекторными функциями, такого как, например, IgG2 или IgG4. Более предпочтительно, когда CH2 и CH3 домены имеют происхождение от IgG2.

Шарнирный участок в норме располагается C-терминально по отношению к 45 CH1 домену постоянного участка тяжелой цепи. В изотипах IgG дисульфидные связи типично возникают в пределах шарнирного участка, что дает возможность 50 образовываться заключительной тетрамерной молекуле. В этом участке строго доминируют пролины, серины и треонины. При включении в настоящее изобретение шарнирный участок обычно является, по крайней мере,

5 гомологичным существующему в природе участку иммуноглобулина, который включает остатки цистеина для образования дисульфидных связей, соединяющих два остатка Fc. Характерные последовательности шарнирных участков для человеческого и мышного иммуноглобулинов могут быть найдены у Borrebaeck, C. A. K., ред., (1992) ANTIBODY ENGINEERING. A PRACTICAL
10 GUIDE, W. H. Freeman и Со. Приемлемые шарнирные участки для настоящего изобретения могут иметь происхождение от IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и других классов иммуноглобулинов. Шарнирный участок IgG1 содержит три цистеина, два из которых вовлечены в дисульфидную связь между двумя тяжелыми 15 цепями иммуноглобулина. Эти одинаковые цистеины позволяют осуществлять формирование эффективного и стойкого дисульфидного связывания между частями Fc. Таким образом, шарнирный участок в соответствии с настоящим изобретением имеет происхождение от IgG1, более предпочтительно от IgG1 20 человека. В некоторых воплощениях первый цистеин в пределах шарнирного участка IgG1 является мутированным с образованием иной аминокислоты, предпочтительно серина. Шарнирный участок изотипа IgG2 содержит четыре 25 дисульфидные связи, которые способствуют усилинию олигомеризации и возможно некорректному дисульфидному связыванию в процессе секреции в рекомбинантных системах. Приемлемый шарнирный участок может иметь 30 происхождение от шарнира IgG2; при этом первые два цистеина являются предпочтительно мутированными с образованием иной аминокислоты. Шарнирный участок IgG4 является известным как такой, который формирует 35 неэффективные дисульфидные связи между цепями. Однако приемлемый шарнирный участок для настоящего изобретения может иметь происхождение от шарнирного участка IgG4, предпочтительно содержащего мутацию, которая 40 способствует правильному формированию дисульфидных связей между остатками тяжелых цепей (Angal S, и др., (1993) Mol. Immunol., 30: 105-8).

45 В соответствии с настоящим изобретением, Fc часть может содержать CH2 и/или CH3 домены и шарнирный участок, которые имеют происхождение от различных изотипов антитела, то есть содержит гибридную Fc часть. Например, в одном воплощении Fc часть содержит CH2 и/или CH3 домены, имеющие 50 происхождение от IgG2 или IgG4, и мутантный шарнирный участок, имеющий происхождение от IgG1. Альтернативно, мутант шарнирного участка, полученный из других подклассов IgG используется в гибридной Fc части.

Например, может использоваться мутантная форма шарнирного участка IgG4, которая позволяет осуществлять эффективное дисульфидное связывание между двумя цепями. Мутантный шарнир может также иметь происхождение от шарнира IgG2, в котором оба первых цистеина являются мутированными с образованием иной аминокислоты. Такие гибридные Fc части способствуют экспрессии на высоком уровне и улучшают правильное объединение Fc-ЕРО слитых белков. Объединение таких гибридных Fc частей было описано в патентной публикации США № 20030044423 (то есть, заявке США №10/093,958), раскрытие которой введено в данную заявку в качестве ссылки).

В некоторых воплощениях Fc часть содержит аминокислотные модификации, которые в общем случае удлиняют период полураспада в сыворотке крови Fc слитых белков. Такие аминокислотные модификации включают мутации, существенно снижающие или устраняющие связывание Fc рецептором или активность в отношении фиксации комплемента. Например, сайт гликозилирования в пределах Fc части тяжелой цепи иммуноглобулина может быть удален. В IgG1 сайт гликозилирования представляет собой Asn297. В других изотипах иммуноглобулина сайт гликозилирования соответствует Asn297 IgG1. Например, в IgG2 и IgG4 сайт гликозилирования представляет собой аспарагин в пределах аминокислотной последовательности Gln-Phe-Asn-Ser. Соответственно, мутация Asn297 IgG1 удаляет сайт гликозилирования в Fc части, имеющей происхождение от IgG1. В одном воплощении Asn297 заменяется Gln. Подобно этому, в IgG2 или IgG4 мутация аспарагина в пределах аминокислотной последовательности Gln-Phe-Asn-Ser удаляет сайт гликозилирования в Fc части, имеющей происхождение от тяжелой цепи IgG2 или IgG4. В одном воплощении аспарагин заменяется глутамином. В других воплощениях фенилаланин в пределах аминокислотной последовательности Gln-Phe-Asn-Ser является дополнительно мутированным для устранения потенциального эпитопа, не принадлежащего Т-клетке, который появляется в результате мутации аспарагина. Например, аминокислотная последовательность Gln-Phe-Asn-Ser в пределах тяжелой цепи IgG2 или IgG4 может быть заменена аминокислотной последовательностью Gln-Ala-Gln-Ser.

Также имеется наблюдение, что аминокислоты вблизи соединения Fc части и части, отличной от Fc части, значительно увеличивают период полураспада в сыворотке крови Fc слитого белка (публикация РСТ WO 01/58957, раскрытие

которой введено в данную заявку в качестве ссылки). В соответствии с этим соединительный участок Fc-ЕРО слитого белка в соответствии с настоящим изобретением может содержать изменения, которые соответственно существующим в природе последовательностям тяжелой цепи иммуноглобулина и эритропоэтина, предпочтительно лежат в пределах приблизительно 10 аминокислот точки соединения. Эти изменения аминокислот могут вызывать 5 повышение гидрофобности путем, например, изменения С-терминального лизина Fc части с образованием гидрофобной аминокислоты, такой, как аланин или лейцин. В других воплощениях Fc часть содержит аминокислотные 10 изменения Leu-Ser-Leu-Ser сегмента поблизости С-терминального конца Fc части тяжелой цепи иммуноглобулина. Аминокислотные замены сегмента Leu-Ser-Leu-Ser устраниют потенциальные соединительные Т-клеточные эпитопы. В 15 других воплощениях аминокислотная последовательность Leu-Ser-Leu-Ser вблизи С-терминального конца Fc части заменена аминокислотной последовательностью Ala-Thr-Ala-Thr. В других воплощениях аминокислоты в 20 пределах сегмента Leu-Ser-Leu-Ser являются замененными другими аминокислотами, такими, как глицин или пролин. Подробно способы получения 25 аминокислотных замен Leu-Ser-Leu-Ser вблизи С-терминального конца IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или молекул других классов иммуноглобулинов были описаны 30 в патентной публикации США № 20030166877 (то есть патентной заявке США № 10/112,582), раскрытие которой введено в данную заявку в качестве ссылки).

Эритропоэтиновая часть

Как используется в данной заявке, термин «эритропоэтиновая часть» 35 охватывает эритропоэтин дикого типа или существующий в природе эритропоэтин, полученный от человека или других видов, рекомбинантный эритропоэтин и эритропоэтиноподобные молекулы, в том числе биологически 40 активные фрагменты эритропоэтина, фрагменты, аналоги, варианты или производные эритропоэтина.

Эрпиропоэтин дикого типа или существующий в природе эрпиропоэтин 45 представляет собой гликопротеиновый гормон, имеющий массу 34 кДа, который стимулирует рост и развитие красных клеток крови из эрпиропоэтиновых клеток-предшественников. Эрпиропоэтин дикого типа или существующий в 50 природе эрпиропоэтин вырабатывается почками в ответ на гипоксию (например, потерю красных клеток крови из-за анемии) и регулирует клеточный рост и

дифференциацию посредством взаимодействия со своим родственным рецептором клеток. Эрпитропоэтин дикого типа или существующий в природе эритропоэтин могут быть изолированы из крови (Miyake T., и др., (1977) *J. Biol. Chem.*, 252: 5558-5564), плазмы крови (Goldwasser, E., и др., (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 68: 697-698) или мочи.

Рекомбинантный или химически синтезированный эритропоэтин может быть получен с помощью способов, хорошо известных специалисту в данной области техники. Являются коммерчески доступными две формы рекомбинантного эритропоэтина человека (rHuEPO): EPOGEN® от Amgen и PROCRIT® от Johnson & Johnson.

Как используется в данной заявке, биологическая активность эритропоэтина определяется как способность стимулировать клеточную пролиферацию посредством взаимодействия с рецептором эритропоэтина. Функциональный анализ эритропоэтина может быть осуществлен *in vitro* или *in vivo*. Например, *in vitro* активность эритропоэтина может быть исследована в клеточном анализе. В частности, эритропоэтиновая активность может быть определена на основе TF-1 анализа клеточной пролиферации. TF-1 клетки экспрессируют EPO рецепторы. Пролиферация TF-1 клеток, которая определяется путем встраивания меченного тритием тимидина, является функцией активности эритропоэтина (Hammerling и др., (1996) *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14: 1455; Kitamura и др., (1989) *J. Cellular Physiol.*, 140: 323). *In vitro* клеточный анализ описан более подробно в Примере 6. *In vivo* анализы обычно осуществляются на животных моделях, таких как, например, мыши и крысы. Примеры *in vivo* анализов включают, но не ограничены, анализы гематокрита (НСТ) и анализы ретикулоцитов. НСТ анализы измеряют объем красных клеток крови из образца крови, взятой из обработанных эритропоэтином животных, их осуществляют путем центрифугирования крови в капиллярных трубках и измеряют фракцию общего объема, который занимают осажденный красные клетки крови. *In vivo* НСТ анализ описан более подробно в Примере 8. Анализы на основе ретикулоцитов позволяют определить количество новых красных клеток крови, также известных как ретикулоциты, которые недавно возникли в результате дифференциации из клеток-предшественников и все еще имеют остаточную характеристику нуклеиновых кислот клеток-предшественников. Ретикулоциты определяют путем сортировки красных клеток

крови в проточном цитометре после окрашивания с помощью красителя для нуклеиновой кислоты, такого как акридиновый оранжевый и тиазоловый оранжевый, и подсчета позитивно окрашенной фракции ретикулоцитов.

Биологически активные или функционально активные эритропоэтиноподобные молекулы обычно имеют существенную подобность или идентичность аминокислотных последовательностей (например, по крайней мере, приблизительно 55%, приблизительно 65%, приблизительно 75% идентичность, обычно, по крайней мере, приблизительно 80% и наиболее типично приблизительно 90-95% идентичность) с соответствующими последовательностями эритропоэтина дикого типа или существующего в природе эритропоэтина и обладают одной или более функциями эритропоэтина дикого типа.

Таким образом, термин «эритропоэтин» в соответствии с настоящим изобретением предназначен для специфического включения полипептидов эритропоэтина, которые обладают аминокислотными последовательностями, аналогичными последовательностям эритропоэтина дикого типа. Такие белки в данной заявке определяются как аналоги эритропоэтина. Термин «аналог» в данной заявке означает аминокислотную последовательность с достаточной подобностью аминокислотной последовательности эритропоэтина дикого типа, которая обладает биологической активностью этого белка. Например, аналог эритропоэтина может содержать одно или более изменений в аминокислотной последовательности эритропоэтина дикого типа, но который все еще обладает способностью стимулировать продукцию красных клеток крови или их созревание. Примеры таких аминокислотных изменений включают добавления, делеции или замены аминокислотных остатков. Эритропоэтин в соответствии с настоящим изобретением также охватывает мутантные белки, которые демонстрируют большую или меньшую биологическую активность, чем эритропоэтин дикого типа, как это описано в патенте США № 5614184.

Эритропоэтин в соответствии с настоящим изобретением также охватывает биологически активные фрагменты эритропоэтина. Такие фрагменты могут включать только часть полноразмерной аминокислотной последовательности эритропоэтина, которая все еще обладает биологической активностью. Как используется в данной заявке, термин «биологически активный фрагмент» означает фрагмент, который может выявлять биологический эффект, подобный

полноразмерному белку. Такие фрагменты могут быть получены путем амино- и карбокситерминальных делеций, а также внутренних делеций. Таковые также включают укороченные и гибридные формы эритропоэтина. «Укороченные формы» представляют собой более короткие варианты эритропоэтина, например, с удаленными аминотерминальными или карбокситерминальными остатками.

Вариации последовательности эритропоэтина

Аминокислотные модификации могут быть введены в эритропоэтиновую часть в соответствии с настоящим изобретением для снижения связывающей аффинности с рецептором EPO; для улучшения стабильности белка, для принятия правильной активной конформации, для улучшения фармакокинетических свойств, для усиления синтеза или для обеспечения других преимущественных свойств. Например, эндоцитоз, опосредованный рецептором EPO, определяется связывающей аффинностью между эритропоэтином и EPO рецептором. Трехмерная структура комплекса человеческого эритропоэтина и рецептора EPO демонстрирует тот факт, что связывание эритропоэтина со своим рецептором доминируется позитивными зарядами на поверхности эритропоэтина и негативными зарядами на рецепторе EPO (Syed *и др.*, (1998) *Nature*, 395: 511). Для снижения кинетики связывания могут быть введены мутации для замены позитивно заряженных аминокислот, которые лежат вблизи поверхности контакта эритропоэтин-рецептор EPO. Например, в одном воплощении один из или оба Arg131 и Arg139 человеческого эритропоэтина могут быть заменены (нумерация аминокислот последовательностей EPO на основе зрелого человеческого EPO). Предпочтительно, когда Arg131 и Arg139 являются замененными глутаминовой кислотой, аспарагиновой кислотой или иной не позитивно заряженной аминокислотой. Мутации могут быть введены в эритропоэтин других видов для замены аминокислот, соответствующих Arg131 и Arg139 человеческого эритропоэтина. Однако для сохранения EPO биологической активности тех остатков, которые находятся в центре взаимодействия EPO-EPO рецептор, следует избегать, когда осуществляют изменения в аминокислотной последовательности EPO.

Альтернативно, можно определить эмпирически те участки или положения, которые будут допускать аминокислотные замены путем аланинового сканирующего мутагенеза (Cunningham *и др.*, (1989) *Science*, 244, 1081-1085). В

этом способе выбранные аминокислотные остатки индивидуально заменяют нейтральной аминокислотой (например, аланином) для того, чтобы определить влияния на биологическую активность.

5 В одном воплощении эритропоэтиновая часть содержит, по крайней мере, одну из следующих мутаций: His32 → Gly и/или Ser34 → Arg, и Pro90 → Ala. В других воплощениях цистеиновые замены вводятся в эритропоэтин для того, 10 чтобы изменить модели цистеин-цистеиновых дисульфидных связей, которые приводят к образованию новой дисульфидной связи («NDS мутации»). Существующий в природе человеческий эритропоэтин, который является 15 уникальным среди эритропоэтинов млекопитающих, имеет точно четыре цистеина в положениях 7, 29, 33 и 161, которые образуют две дисульфидные связи. Один или более из этих цистеиновых остатков эритропоэтиновой части могут быть изменены. Для получения измененной дисульфидной связи один 20 цистеиновый остаток подвергают мутации с получением структурно совместимой аминокислоты, такой, как аланин или серин, а вторую аминокислоту, которая находится вблизи трехмерной структуры, подвергают 25 мутации с образование цистеина. Например, одну из аминокислот Gln₈₆, Pro₈₇, Trp₈₈, Glu₈₉ и Leu₉₁ можно заменить Cys. Если Trp₈₈ является замененным на 30 Cys, а Cys₃₃ заменен другой аминокислотой, то эритропоэтиновая часть будет образовывать Cys₂₉-Cys₈₈ дисульфидную связь, которая отсутствует в человеческом ЕРО. Эта связь приводит к образованию слитого белка, который 35 обладает большей активностью, чем слитый белок с типичной Cys₂₉-Cys₃₃ дисульфидной связью. В дополнение к этому Cys₂₉-Cys₈₈ слитый белок демонстрирует значительное повышение активности по сравнению с Cys₂₉-Cys₃₃ 40 слитым белком в присутствии других мутаций эритропоэтиновой части слитого белка. В соответствии с этим в одном воплощении настоящего изобретения эритропоэтиновая часть включает, по крайней мере, одну из следующих 45 аминокислотных замен: остаток, отличный от цистеина, в положении 29, остаток, отличный от цистеина, в положении 33, остаток цистеина в положении 88 и остаток цистеина в положении 139. В одном воплощении эритропоэтиновая 50 часть содержит цистеины в положениях 7, 29, 88 и 161. В другом воплощении эритропоэтиновая часть дополнительно содержит одну или более из следующих

замен: His₃₂ → Gly, Cys₃₃ → Pro и Pro₉₀ → Ala. В альтернативном воплощении совсем новая дисульфидная связь прибавляется к белку посредством мутирования двух аминокислот с образованием цистеинов. Для компенсации возможных напряжений в структуре, которые могут вызвать Cys мутации в предпочтительном Cys-сконструированном воплощении этого изобретения эритропоэтиновая часть дополнительно содержит мутации, предназначенные для ослабления этих потенциальных напряжений.

Дополнительные воплощения, относящиеся к цистеиновым заменам, описаны в публикации РСТ WO 01/36489 (то есть, заявке США № 09/708,506), раскрытие которой введено в данную заявку в качестве ссылки.

Способы введения мутаций в эритропоэтин являются хорошо известными в области техники. Например, мутации могут быть введены с помощью методик сайт-направленного мутагенеза. Важно отметить, что широкое разнообразие методик сайт-направленного мутагенеза может быть использовано в качестве альтернатив для достижения подобных результатов. Другие способы включают, но не ограничены таковыми, произвольный или полупроизвольный мутагенез.

25 *Линкер*

Fc-EPO слитые белки в соответствии с данным изобретением могут включать линкерную молекулу, предпочтительно пептидный линкер, между Fc частью и эритропоэтиновой частью. Слитый белок с линкером может обладать улучшенными свойствами, такими как повышенная биологическая активность. Линкер обычно находится между 1 и 25 аминокислотами (например, между 5 и 25 или между 10 и 20 аминокислотами). Линкер может быть предназначен для того, чтобы не включать сайта расщепления протеазой. Кроме того, линкер может содержать N-связанный или O-связанный сайт гликозилирования для стерического ингибирования протеолиза. В соответствии с этим в одном воплощении линкер содержит аминокислотную последовательность Asn-Ala-Thr.

Дополнительные приемлемые линкеры раскрыты у Robinson и др., (1998), Ртс. Natl. Acad. Sci. USA: 95, 5929, и заявке США № 09/708,506.

45 *Гликозилирование*

Существующий в природе эритропоэтин и рекомбинантный эритропоэтин, экспрессируемый в клетках млекопитающих, содержит три N-связанных и одну O-связанную олигосахаридные цепи. N-связанное гликозилирование происходит

на остатках аспарагина, которые находятся в положениях 24, 38 и 83, в то время как О-связанное гликозилирование происходит на остатке серина, который находится в положении 126 (Lai *et al.*, (1986) *J. Biol. Chem.*, 261: 3116; Broudy *et al.*, (1988) *Arch. Biochem. Biophys.*, 265: 329). Как было показано, олигосахаридные цепи являются модифицированными с помощью терминальных остатков сиаловой кислоты. N-связанные цепи обычно содержат до четырех сиаловых кислот на цепь, а О-связанные цепи содержат до двух сиаловых кислот. Эритропоэтиновый полипептид может, таким образом, содержать в общей сложности до 14 сиаловых кислот.

Сиаловая кислота представляет собой терминальный сахар на N-связанных или О-связанных олигосахаридах. Степень сиалирирования варьирует от сайта к сайту, от белка к белку, и может зависеть от условий культивирования клеток, типа клеток и, в частности, от используемого клеточного клона. Было обнаружено, что Fc-EPO слитый белок в соответствии с настоящим изобретением, синтезированный в клетках ВНК, является высоко сиалирированным. Было также обнаружено, что степень сиалирирования Fc-EPO слитого белка может быть дополнительно повышена путем адаптации ВНК клеток к росту в среде, не содержащей белка, в суспензии или в среде, не содержащей белка, и в суспензии. Некоторые линии клеток, которые обычно используются, такие как NS/0, PerC6, или 293 клетки, не имели успеха в отношении продукции высоко сиалирированного Fc-EPO слитого белка при стандартных условиях культивирования. Степень сиалирирования Fc-EPO слитого белка, полученного из различных линий клеток, может быть определена с помощью изоэлектрофокусирующего (IEF) гель-электрофореза на основании остатков сиаловой кислоты с высоким зарядом; детали осуществления IEF гель-электрофореза описаны в Примере 5В. Степень сиалирирования Fc-EPO слитого белка, полученного в различных линиях клеток, может быть также количественно подтверждена с помощью исследования связывания лектина при использовании способов, знакомых специалисту в данной области техники.

Пример анализа связывания лектина описан в примере 5В.

Обычно популяция высоко сиалирированных очищенных Fc-EPO слитых белков в соответствии с настоящим изобретением содержит в среднем 11-28 остатков сиаловой кислоты на очищенный Fc-EPO слитый белок. Предпочтительно сиалирированные популяции Fc-EPO слитых белков содержат

в среднем 13-28, 15-28, 17-28, 19-28 или 21-28 остатков сиаловой кислоты на очищенный Fc-ЕРО слитый белок. Например, одна предпочтительно высоко сиалинированная популяция Fc-ЕРО слитых белков содержит в среднем от 20 до 22 остатков сиаловой кислоты на очищенный Fc-ЕРО слитый белок. Другая предпочтительная популяция Fc-ЕРО слитых белков содержит в среднем 23-28 остатков сиаловой кислоты на очищенный Fc-ЕРО слитый белок.

Фармакокинетика сиалинированного Fc-ЕРО слитого белка

Один из наиболее важных факторов, определяющих *in vivo* биологическую активность агентов, стимулирующих эритропоэз, представляет собой продолжительность времени, в течение которого концентрация в сыворотке крови белка остается выше порогового значения, необходимого для эритропоэза. что определяется фармакокинетикой агентов, стимулирующих эритропоэз. Фармакокинетический профиль высоко сиализированного Fc-ЕРО слитого белка отличается от такового для существующего в природе эритропоэтина или рекомбинантного эритропоэтина. Основное различие заключается в том, что высоко сиализированный Fc-ЕРО слитый белок имеет намного больший период полураспада в сыворотке крови и намного более медленный клиренс, что приводит к повышенной *in vivo* биологической эффективности. Не желая ограничиваться теорией, можно предположить, что остатки сиаловой кислоты повышают негативный заряд молекулы эритропоэтина, что приводит к пониженной кинетике связывания с рецептором негативно заряженного ЕРО и снижает эндоцитоз, опосредованный рецептором ЕРО, продлевая период полураспада в сыворотке крови. Кроме того, сиаловые кислоты также препятствуют осуществлению эндоцитоза белков эритропоэтина с помощью асиалогликопротеиновых рецепторов, которые связывают гликопротеины с находящимися на поверхности остатками галактозы.

В общем случае, большинство фармакокинетических профилей терапевтических молекул, таких как эритропоэтин, после введения показывают первичное падение концентраций в сыворотке крови (альфа фаза), после которого следует постепенное снижение (бета фаза).

Факторы, влияющие на альфа фазу

В соответствии с теорией фармакокинетики небольших молекул альфа фаза определяет объем распределения, который описывает, каким образом молекула распределяется по компартментам вне крови. Падение, наблюдаемое в альфа

фазе, широко варьирует для различных слитых белков Fc-EPO, синтезированных в различных линиях клеток. Теоретически различие может быть благодаря 5 вариации объема распределения или благодаря вариациям оборота между компартментами. Однако было сделано наблюдение, что существует корреляция между степенью сиалирирования и фармакокинетическим поведением Fc-EPO белков у мышей. Например, Fc-EPO слитые белки, синтезированные в клетках 10 BHK, являются высоко сиалирированными и демонстрируют наилучший фармакокинетический профиль. Fc-EPO слитые белки, синтезированные в клетках NS/0, являются в некоторой степени сиалирированными и имеют 15 промежуточный фармакокинетический профиль. Fc-EPO слитые белки, синтезированные в клетках 293 и PerC6, имеют незначительное сиалирирование или 20 вообще являются несиалирированными, они имеют слабый фармакокинетический профиль, характеризующийся приблизительно 100-кратным падением в сыворотке крови концентрации в течение 30 минут. Таким образом, ключевой фактор, который влияет на альфа фазу определенного Fc-EPO 25 слитого белка, представляет собой распределение видов гликозилирования и уровень сиалирирования. Fc-EPO слитые белки, которые являются недостаточно сиалирированными, могут исчезать чрезвычайно быстро.

В дополнение к этому, как показано на Фигуре 2, степень падения 30 концентраций Fc-EPO в сыворотке крови во время альфа фазы варьирует в соответствии с дозой, что свидетельствует о том, что это поведение является насыщаемым и, наиболее вероятно, опосредованным рецептором. Является 35 возможным, что опосредование рецептором падения в альфа фазе не относится ни к рецептору EPO, ни к рецептору Fc, а связано с другим рецептором, таким, как асиалогликопротеиновый рецептор. Aranesp® имеет пониженную 40 связывающую аффинность с рецепторами EPO по сравнению с нормальным эритропоэтином человека, поскольку Aranesp® имеет повышенный негативный заряд в результате наличия дополнительных N-связанных сайтов 45 гликозилирования. Однако Aranesp® и нормальный эритропоэтин человека демонстрируют подобные падения концентрации во время альфа фаз. В дополнение к этому, поскольку обычно количество рецепторов EPO на 50 поверхности эритроидной клетки-предшественника составляет только 200, то эти рецепторы были бы полностью насыщенными при намного более низких дозах эритропоэтина, чем те, которые используются на Фигуре 2. Является

5 маловероятным, что Fc рецепторы опосредуют значительное падение альфа фазы, поскольку Fc-EPO слитые белки с мутацией, устраняющей сайт гликозилирования, например, мутацией аминокислоты, соответствующей Asn297 IgG1, все еще могут демонстрировать крутое падение в альфа фазе. В дополнение к этому, несмотря на то, что CH2 участки IgG2 в случае, когда они 10 не являются агрегированными, в общем случае не связываются с Fc рецепторами, Fc-EPO белки, содержащие CH2 участки IgG2, все еще демонстрируют значительное падение в альфа фазе.

15 Без желания связывать это с теорией, можно сказать, что падение концентрации в сыворотке крови Fc-EPO слитых белков во время альфа фазы может быть опосредовано асиалогликопротеиновыми рецепторами с помощью опосредованного асиалогликопротеиновыми рецепторами эндоцитоза. Слабо 20 сиалированные Fc-EPO слитые белки содержат открытые остатки галактозы, которые могут связываться с асиалогликопротеиновым рецептором, что приводит к опосредованному асиалогликопротеиновыми рецепторами эндоцитозу. В результате этого слабо сиалированные Fc-EPO слитые белки 25 могут очень быстро исчезать.

Факторы, влияющие на бета фазу

30 Падение концентраций Fc-EPO слитых белков в бета фазе является менее крутым по сравнению с альфа фазой. Например, у мышей через 8 - 24 часа после введения наблюдают двух- - трехкратное падение концентраций в сыворотке крови Fc-EPO слитых белков. Различие в падении во время бета фазы также 35 является не таким значительным для различных Fc-EPO белков, синтезированных в различных линиях клеток. Однако, подобно альфа фазе степень сиалирования коррелирует с фармакокинетическим поведением в бета фазе. Например, Fc-EPO слитые белки, синтезированные в клетках ВНК, имеют 40 значительно улучшенные характеристики бета фазы по сравнению с другими идентичными Fc-EPO белками, синтезированными в клетках NS/0. Опосредованный рецептором эндоцитоз, как выясняется, является, по крайней 45 мере, частично ответственным за падение концентрации в сыворотке крови Fc-EPO слитых белков во время бета фазы. Aranesp®, который имеет пониженную аффинность связывания для рецепторов EPO по сравнению с нормальным 50 человеческим эритропоэтином, имеет значительно улучшенную бета фазу по

сравнению с нормальным эритропоэтином человека, несмотря на подобные профили альфа фазы.

5 Fc-EPO слитые белки в соответствии с изобретением обычно демонстрируют улучшенную бета фазу по сравнению с существующим в природе эритропоэтином или рекомбинантным эритропоэтином, что свидетельствует о том, что присоединение Fc части значительно замедляет 10 падение концентраций в сыворотке крови во время бета фазы. Было сделано наблюдение, что определенные аминокислотные модификации в Fc части или в 15 эритропоэтиновой части могут значительно улучшить бета фазу. Например, мутации, устраняющие сайт гликозилирования Fc части, улучшают бета фазу для Fc-EPO слитых белков. Мутации, повышающие стабильность эритропоэтиновой 20 части, например, мутации конструирующие дисульфидные связи (например, NDS мутации) в эритропоэтиновой части, значительно улучшают бета фазу Fc-EPO слитых белков. Обычно улучшенная бета фаза продлевает заключительный 25 период полураспада в сыворотке крови Fc-EPO слитого белка.

Пути выведения Fc-EPO слитых белков

25 Существует несколько возможных путей выведения молекул белка эритропоэтина из организма. Молекула белка эритропоэтина дикого типа и существующего в природе эритропоэтина может выводиться из организма путем почечной фильтрации и опосредованного рецептором эндоцитоза. Эритропоэтин, подвергнутый эндоцитозу, эффективно разлагается. Как показано 30 на Фигуре 3, прибавление Fc части к эритропоэтиновой части будет существенно устранять экскрецию Fc-EPO слитого белка почками. В результате этого 35 опосредованный рецептором эндоцитоз является основным путем выведения Fc-EPO слитого белка. Кроме того, прибавление Fc части к эритропоэтиновой части 40 будет также снижать разложение после интернализации, поскольку FcRn эндосомальные рецепторы предполагаются как такие, которые возвращают слитый белок в оборот клетки.

45 В принципе, по крайней мере, три типа рецепторов могут опосредовать клиренс Fc-EPO слитого белка, а именно Fc-рецептор, EPO рецептор и асиалогликопротеиновый рецептор.

50 Клиренс Fc-EPO слитого белка с помощью Fc рецептора будет значительно снижаться при использовании в Fc части CH2 домена, имеющего происхождение от IgG2, вместо домена CH2, имеющего происхождение от IgG1,. Домены CH2,

имеющие происхождение от IgG2, имеют приблизительно в сто раз меньшую аффинность для FC γ RI, который имеет наивысшую аффинность для IgG, по сравнению с CH2 доменами, имеющими происхождение от IgG1.

5 Взаимодействие между CH2, имеющим происхождение от IgG2, и FC γ RI не выявляется в большинстве анализов связывания. Однако остаточная FC γ R-связывающая активность CH2 домена, имеющего происхождение от IgG2, может

10 все еще играть роль в клиренсе Fc-ЕРО слитого белка, поскольку аспарагиновая мутация, устраняющая сайт гликозилирования в CH2 домене, дополнительно снижает связывание с Fc-рецептором и улучшает фармакокинетические

15 характеристики Fc-ЕРО слитого белка.

NDS мутации имеют влияние на стабилизацию структуры эритропоэтина и в результате этого, как предполагается, снижают разложение Fc-ЕРО слитого белка после интернализации. Fc-ЕРО слитые белки, содержащие NDS мутации, обладают улучшенными фармакокинетическими свойствами и повышенным периодом полураспада в сыворотке крови.

Сиалирирование повышает негативный заряд Fc-ЕРО слитых белков, снижая связывающую аффинность Fc-ЕРО слитого белка для ЕРО рецептора. Сиалирирование также снижает количество открытых остатков галактозы на Fc-ЕРО слитом белке, понижая связывающую аффинность Fc-ЕРО слитых белков для асиалогликопротеиновых рецепторов. В соответствии с этим, как показано на Фигуре 3, сиалирирование снижает как эндоцитоз, опосредованный рецептором ЕРО, так и эндоцитоз, опосредованный асиалогликопротеиновым рецептором. Высоко сиалирированные Fc-ЕРО слитые белки, таким образом, имеют в значительной степени замедленные скорости клиренса, что приводит к значительному повышению периода полураспада в сыворотке крови. Присоединение Fc части, изменения в Fc и эритропоэтиновых частях, а также 40 сиалирирование снижают клиренс Fc-ЕРО слитых белков. Объединенные эффекты влияния на клиренс и период полураспада в сыворотке крови являются аддитивными или мультипликативными.

45 *In vitro* активность и *in vivo* эффективность Fc-ЕРО слитого белка

45 *In vitro* активность Fc-ЕРО белков можно анализировать в клеточном анализе. В частности, взаимодействие между Fc-ЕРО и ЕРО рецептором можно определить на основе анализа пролиферации TF-1 клеток. TF-1 клетки 50 экспрессируют ЕРО рецепторы, таким образом, пролиферация TF-1 клеток,

которая определяется путем встраивания меченного тритием тимицина, представляет собой функцию активности эритропоэтина (Hammerling *и др.*, (1996) *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14: 1455; Kitamura *и др.*, (1989) *J. Cellular Physiol.*, 140: 323). В настоящем изобретении пролиферация клеток TF-1 представляет собой функцию взаимодействия между эритропоэтиновой частью и EPO рецепторами. В частности, если эритропоэтиновую часть Fc-EPO слитого белка имеет сниженную кинетику для EPO рецептора, то Fc-EPO белок обычно имеет сниженную активность в клеточном анализе (отмечается повышенным значением ED50).

Данные клеточных анализов, которые сравнительно легко можно получить, обычно коррелируют с фармакокинетикой и *in vivo* эффективностью Fc-EPO белка. Сниженная активность *in vitro*, свидетельствующая о сниженной кинетике для EPO рецептора, обычно коррелирует с улучшенными фармакокинетическими свойствами и улучшенной эффективностью *in vivo*. В противовес этому улучшенная активность *in vitro* (отмечается сниженным значением ED50), свидетельствующая о повышенной кинетике для EPO рецептора, обычно коррелирует со слабыми фармакокинетическими свойствами и сниженной *in vivo* эффективностью.

In vivo биологические активности Fc-EPO слитых белков могут измеряться с помощью анализов, осуществляемых на животных моделях, таких как, например, мыши и крысы. Примеры *in vivo* анализов включают, но не ограничены, анализы гематокрита (НСТ) и анализы ретикулоцитов. НСТ анализы измеряют объем крови, занимаемый красными клетками крови (RBC), они осуществляются посредством центрифугирования крови в капиллярных трубках и измерения фракции общего объема, занятого осажденными RBC. Ретикулоциты представляют собой новые RBC, которые недавно возникли в результате дифференциации из клеток-предшественников и все еще характеризуются остатками нуклеиновых кислот из клеток-предшественников. Ретикулоциты измеряют путем сортировки красных клеток крови в проточном цитометре после окрашивания с помощью красителя для нуклеиновой кислоты, такого как акридиновый оранжевый и тиазоловый оранжевый, и подсчета позитивно окрашенной фракции ретикулоцитов. Обычно гематокрит и ретикулоциты измеряют два раза в неделю.

5 Данные относительно ретикулоцитов представляют собой по существу первую производную данных гематокрита. Число ретикулоцитов представляет собой меру скорости продукции красных клеток крови, в то время как гематокриты измеряют общее число красных клеток крови. В типичном эксперименте гематокриты животных, которым вводили Fc-ЕРО слитые белки, будут увеличиваться, а потом снижаться до базовой линии. Когда гематокриты 10 явленияются высокими и вводимые Fc-ЕРО белки исчезают из системы кровообращения животных, число ретикулоцитов понижается ниже базовой линии, поскольку эритропоэз угнетается.

15 Ретикулоциты в норме появляются из костного мозга через 4 дня после того, как предшественники перейдут в разряд RBC. Однако в присутствии высоких уровней эритропоэтина ретикулоциты будут часто покидать костный мозг через 1-3 дня после введения.

20 В ответ на введение Fc-ЕРО белков показания гематокрита у животного увеличиваются, остаются стабильными, а потом возвращаются к базовой линии. Примеры таких ответов гематокрита показаны на Фигурах 4-6. Максимальная 25 скорость снижения составляет приблизительно 7% от объема крови в неделю, что соответствует периоду полураспада RBC приблизительно 45 дней у мышей и приблизительно 5% от объема крови в неделю у крыс, что соответствует периоду полураспада RBC приблизительно 65 дней у крыс. Максимальная скорость снижения предположительно представляет разрушение RBC в отсутствие нового синтеза. Если биологически активные Fc-ЕРО белки остаются в системе при 30 концентрации, выше пороговой для эритропоэза, то уровень гематокрита будет оставаться высоким и не снижается, даже если уровень биологически активного Fc-ЕРО не определяется в фармакокинетических экспериментах.

35 Было обнаружено, что фармакокинетические свойства Fc-ЕРО белка 40 коррелируют с *in vivo* эффективностью белка. Все характеристики настоящего изобретения, которые повышают фармакокинетику Fc-ЕРО слитого белка, как обсуждалось выше, также повышает *in vivo* эффективность в экспериментах на животных. Как показано в Таблице 1, такие характеристики включают, 45 например, присоединение Fc части, устранение сайта гликозилирования в Fc части (например, N → Q замену в положении, соответствующем Asn297 IgG1), введение NDS мутаций в эритропоэтиновую часть и высокие уровни 50 сиалирирования путем синтеза Fc-ЕРО белка в клетках ВНК.

Таблица 1 факторы, которые влияют на фармакокинетику и биологическую активность Fc-ЕРО белков

Характеристики	Влияние на эффективность <i>in vitro</i>	Влияние на фармакокинетику	Влияние на активность <i>in vivo</i>
Синтез в ВНК клетках (против клеток NS/0)	Снижение	Повышение	Повышение
Прибавление Fc	Небольшое повышение	Повышение	Повышение
NDS мутации	Отсутствует	Повышение	Повышение
N → Q	Отсутствует	Повышение	Повышение
g2h (против g4h)	Повышение	Повышение	Повышение

Было обнаружено, что эритропоэтиновая часть при использовании Fcg2h(FN → AQ)-Еро и Fcg2h-EPO(NDS), полученных из ВНК клеток, демонстрирует наилучшую фармакокинетику и наиболее эффективные *in vivo* биологические активности. Каждый из Fcg2h(FN → AQ)-Еро и Fcg2h-EPO(NDS) имеет более продолжительный период полураспада в сыворотке крови и более эффективен в отношении *in vivo* активности эритропоэтиновой части, чем Aranesp®.

Синтез Fc-ЕРО слитых белков

Fc-ЕРО слитый белок в соответствии с настоящим изобретением может быть получен в соответствующих клетках или клеточных линиях. Приемлемые линии клеток включают, но не ограничены, клетки почки детеныша хомяка (ВНК), клетки яичника китайского хомяка (СНО) (включая клетки, дефицитные по дигидрофолатредуктазе (DHFR)) и клетки COS. В предпочтительном воплощении используются клетки ВНК.

Для экспрессии Fc-ЕРО слитого белка в приемлемые хозяйственные клетки (например, ВНК клетки) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие Fc-ЕРО слитый белок, сначала вводят в экспрессионный вектор при использовании стандартных молекулярных рекомбинантных методик, которые известны среднему специалисту в данной области. Последовательности, кодирующие эритропоэтиновую часть, являются предпочтительно оптимизированными по кодонам для высокого уровня экспрессии. Оптимизированный по кодонам человеческий эритропоэтин был описан в РСТ публикации WO 01/36489 (т. е. заявке США № 09/708,506), раскрытие которой введено в данную заявку в качестве ссылки. Типичная последовательность

нуклеиновой кислоты, кодирующей эритропоэтиновую часть, обеспечивается в SEQ ID NO: 1:

CCCCCACCACGCCTCATCTGTGACAGCCGAGTGCTGGAGAGGTACCTCTGG
AGGCCAAGGAGGCCGAGAATATCACGACCGGCTGTGCTGAACACTGCAGCT
TGAATGAGAACATCACCGTGCCTGACACCAAAGTGAATTCTATGCCTGGAA
GAGGATGGAGGTTGCCAGCAGGCCGTAGAAGTGTGGCAGGCCCTGGCCCT
GCTGCGGAAGCTGCTCGGGGCCAGGCCCTGTTGGTCAACTCTTCCCAG
CCGTGGAGCCCTGCAACTGCATGTGGATAAAGCCGTGAGTGGCCTCGCA
GCCTCACCACTCTGCTCGGCCTGGAGCCCAGAAGGAAGCCATCTCCCC
TCCAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCCTCCGCACAATCACTGCTGACACTTCC
GCAAACCTTCCGAGTCACTCCAATTCCCTCCGGGGAAAGCTGAAGCTGTA
CACAGGGGAGGCCTGCCGGACAGGGGACAGATGA (SEQ ID NO: 1)

Типичные последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей предпочтительную Fc часть, например, Fc часть, включающую CH2 домен, который имеет происхождение от IgG2, и шарнирный участок, имеющий происхождение от IgG1, были описаны в патентной публикации США № 20030044423 (т.е. заявке США № 10/093,958), раскрытие которой введено в данную заявку в качестве ссылки.

В общем случае последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc-ЕРО слитый белок, включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сигнальный пептид (лидерная последовательность). Лидерная последовательность отщепляется в процессе секреции. Типичная последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 2), кодирующая зрелый Fc-ЕРО белок без лидерной последовательности, показана на Фигуре 7.

Приемлемые векторы включают таковые, приемлемые для экспрессии в 40
хозяйской клетке млекопитающего. Векторы могут представлять собой, например, плазмиды или вирусы. Такой вектор будет в общем случае включать следующие элементы: промотор и другие вышерасположенные регуляторные элементы, источник репликации, сайт связывания рибосом, сайт терминации 45
транскрипции, полилинкерный сайт и селективный маркер, который является совместимым с использованием в хозяйской клетке млекопитающего. Векторы также могут содержать элементы, которые также позволяют размножать и поддерживать прокариотические хозяйственные клетки. Приемлемые векторы для 50
настоящего изобретения включают, но не ограничены, pdCs-Fc-X и векторы,

которые полученные из него, а также pHC10-Fc-X и векторы, которые полученные из него.

5 Векторы, кодирующие Fc-ЕРО белки, вводят в хозяйские клетки с помощью стандартных методик клеточной биологии, которые включают трансфекцию и вирусные методики. Под трансфекцией понимают перенос генетической информации в клетку при использовании изолированной ДНК, РНК или 10 синтетического нуклеотидного полимера. Приемлемые способы трансфекции включают, но не ограничены, копреципитацию, опосредованную фосфатом кальция (Sambrook *и др.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2-ое изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press), липофекцию (например, 15 Липофектамин Плюс от Life Technologies, Rockville, Maryland), способы трансфекции, опосредованные DEAE-декстраном, лизоцимное слияние и слияние с эритроцитами, соскоб, прямое поглощение, осмотический или 20 сахарозный шок, непосредственную микроинъекцию, такую, как с помощью опосредованных эритроцитами методик, слияние протопластов, или таковые, 25 осуществляемые с помощью воздействия на хозяйские клетки электрическими токами (например, электропорацию) и другие. Приведенный выше список способов трансфекции нельзя считать исчерпывающим, поскольку могут быть разработаны другие способы для введения генетической информации в клетки.

30 Для улучшения селекции хозяйских клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую Fc-ЕРО слитый белок, нуклеиновая кислота, кодирующая Fc-ЕРО слитый белок, обычно вводится с селективным маркером. Селективный 35 маркер может кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты, присутствующей в том же векторе экспрессии, который кодирует Fc-ЕРО слитый белок. Альтернативно, селективный маркер может кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты, которая присутствует в другом 40 векторе. В последнем случае два вектора могут быть совместно введены в хозяйские клетки либо путем котрансфекции, либо путем котрансдукции. Приемлемые селективные маркеры включают, например, гигромицин В (Hyg B) 45 и дигидрофолатредуктазу (DHFR).

50 Временная экспрессия является полезной для получения небольших количеств белка и для быстрого анализа Fc-ЕРО слитого белка. Хозяйские клетки, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fc-ЕРО слитый белок, поддерживаются в условиях, приемлемых для экспрессии

кодируемого Fc-ЕРО слитого белка. Стандартные способы культивирования клеток, условия и среды могут быть полезными для поддержания хозяйственных клеток, экспрессирующих ЕРО слитый белок.

5 Стабильно трансфицированные клетки часто являются предпочтительными для продукции белка в больших количествах, высокой экспрессии и для других целей. Стабильно поддерживаемая нуклеиновая кислота может присутствовать в 10 любой из различных конфигураций хозяйственной клетки. Например, в одном воплощении стабильно поддерживаемую последовательность нуклеиновой кислоты интегрируют в хромосому хозяйственной клетки. В других воплощениях 15 стабильно поддерживаемая последовательность нуклеиновой кислоты может присутствовать в виде экстрахромосомного набора, в виде искусственной хромосомы, или в виде иной приемлемой конфигурации.

20 В одном воплощении для синтеза Fc-ЕРО слитого белка используют ВНК клетки. Для того чтобы получить стабильно трансфицированную ВНК клетку, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый белок, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей селективный маркер, 25 вводят в ВНК клетки, предпочтительно путем методов электропорации, слияния протопластов или липофекции. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая селективный маркер, могут присутствовать в одном и том же 30 экспрессионном векторе. Альтернативно, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая селективный маркер, могут присутствовать в различных 35 векторах. Предпочтительный селективный маркер для стабильного введения в ВНК клетку представляет собой Нуг В. Другие селективные маркеры, такие, как DHFR, также могут использоваться. Стабильно трансфицированные клоны 40 изолируют и размножают посредством их выращивания в присутствии Нуг В при приемлемой концентрации (например, 200, 250 или 300 микрограмм/мл), в стандартной среде для выращивания культуры ткани, например, МЕМ + FBS, 45 DMEM/F-12 среде или VP-SFM, которая является доступной от Life Technologies, и в других приемлемых средах. Уровни экспрессии Fc-ЕРО слитого белка могут отслеживаться с помощью стандартных анализов для определения 50 белка, таких как, например, ELISA анализ, Вестерн-блоттинг анализ, дот-блоттинг или с помощью других приемлемых анализов на образцах из

супернатантов и культуральных сред. Клоны с высокой экспрессией подвергают отбору и размножают в больших объемах.

5 В типичном случае ВНК клетка представляет собой прикрепленную к субстрату линию клеток, которая обычно выращивается в среде, содержащей сыворотку, такой как MEM + 10% инактивированная прогреванием плодная сыворотка теленка (FBS). Однако ВНК клетки могут быть адаптированы для 10 роста в суспензии и в среде, не содержащей сыворотки, такой как, например, VP-SFM (Invitrogen Corp., cat # 11681-020) или Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp., cat # 12309). Пример процедуры адаптации описан в Примере 3. ВНК клетки, 15 адаптированные для роста в среде, не содержащей сыворотки, могут быть дополнительно адаптированы для роста в среде, не содержащей белка, такой как, например, DMEM/F-12 (Invitrogen Corp., cat # 11039-021). Один пример процедуры адаптации описан в Примере 3. Предпочтительно, когда DMEM/F-12 20 является дополненной приемлемыми аминокислотами и другими компонентами, такими как, например, глутамин, белковые гидролизаты, такие как, HyPep 4601 (Quest International, cat # 5Z10419) и HyPep 1510 (Quest International, cat # 25 5X59053), этаноламин (Sigma, cat# E0135), и Трополен (Sigma, cat # T7387). Приемлемые концентрации каждой добавки могут быть определены 30 эмпирически специалистом в данной области техники с помощью традиционных экспериментов.

35 Fc-ЕРО слитые белки, синтезированные в клетках ВНК, и выращенные в среде, не содержащей белка, являются сиализованными в значительной мере и демонстрируют более гомогенное сиализование, чем, соответствующий белок, синтезированный в клетках, выращенных на среде, содержащей сыворотку (например, MEM + FBS) или в среде, не содержащей сыворотки, но не в среде, не содержащей белка (например, VP-SFM). В дополнение к этому, Fc- 40 ЕРО белок, полученный таким образом, является существенно неагрегированным, то есть приблизительно 98% от общего выхода белка являются неагрегированными. Выход белка из клеток ВНК, выращенных на 45 среде, не содержащей белка, является подобным таковому, полученному на клетках ВНК, выращенных на среде, содержащей сыворотку, то есть составляет более 10 микрограмм/мл (мкг/мл). Таким образом, выращивание в суспензии 50 и/или в среде, не содержащей белка, обеспечивает ряд преимуществ, в том числе 1) улучшение фармакокинетики Fc-ЕРО слитого белка, что является результатом

повышенного сиалирирования; и 2) совершенствование последующих процессов очистки, поскольку белки могут быть очищены от клеток, выращиваемых в супензионном режиме и в среде, не содержащей белка.

5 *Очистка*

Очистка Fc-ЕРО осуществляется в соответствии со следующими GMP 10 процедурами, известными специалистам в данной области. Белок обычно очищают до гомогенности или приблизительной гомогенности. Хроматографические очистки, такие как те, что вовлекают колоночную 15 хроматографию, в общем случае являются предпочтительными. Обычно схема очистки для Fc-ЕРО слитого белка может включать, но не ограничена, этап начального поглощения белка, этап инактивации вируса, один или более этапов 20 доочистки, этап удаления вируса, этап концентрирования белка и/или этап рецептирования. Например, хроматографические материалы на основе смол, 25 которые связывают Fc часть слитого белка, могут использоваться для поглощения Fc-ЕРО белков. Приемлемые материалы на основе смол включают, но не ограничены, смолы, сконденсированные с протеином А. Этапы доочистки 30 могут быть включены для удаления загрязняющих компонентов. Например, хроматография на основе гидроксиапатитов, хроматография на основе Сефарозы Q, вытеснительная хроматография могут использоваться для удаления 35 загрязняющих веществ. Один способ очистки с применением колоночной хроматографии на основе протеина А для связывания Fc части и очистки Fc-ЕРО слитого белка описан в Примере 12 как оптимальный способ для инактивации и 40 удаления вируса. Очищенные белки обычно концентрировали до желаемой концентрации при использовании ультрафильтрации, подвергали диафильтрации в приемлемый буфер для композиции, стерилизовали фильтрацией и заполняли ими флаконы.

40 *Введение*

Фармацевтические композиции и пути введения

Настоящее изобретение также обеспечивает фармацевтические композиции, 45 содержащие Fc-ЕРО белок, полученный в соответствии с настоящим изобретением. Эти фармацевтические композиции могут использоваться для стимуляции продукции красных клеток крови, а также для предотвращения и 50 лечения анемии. Состояния, которые могут подвергаться лечению в соответствии с настоящим изобретением, включают анемию, ассоциированную с

недостаточностью и утратой функции почек (хроническая почечная недостаточность), анемио, ассоциированную с миелосупрессивной терапией или антивирусными лекарственными средствами (такими, как AZT), анемио, ассоциированную с развитием немиелоидных форм рака, анемио, ассоциированную с вирусными инфекциями (такими, как ВИЧ) и анемио, ассоциированную с хроническим заболеванием. Состояниями, которые могут подвергаться лечению, являются те, которые могут приводить к анемии иным путем у здоровых индивидуумов, например, ожидаемая потеря крови при хирургических операциях. В общем случае любое состояние, которое может подвергаться лечению с помощью гHuEro, может также лечиться с помощью Fc-EPO слитого белка в соответствии с изобретением.

Композиции, содержащие Fc-EPO белки

В общем случае композиция содержит Fc-EPO белок, буфер и сурфактант в жидкой или твердой форме. Твердые композиции также включают, но не ограничены, высушенные с помощью сублимационной сушки, высушенные распылением или высушенным сублимационной сушкой с распылением композиции. Жидкие композиции предпочтительно основаны на воде, но могут содержать другие компоненты, такие как, например, этанол, пропанол, пропандиол или глицерин и другие.

Fc-EPO белки рецептируют в водных растворах в соответствии со стандартными GMP процедурами, известными специалисту в данной области. В общем случае композицию получают при перемешивании определенных объемов водных растворах, включающих приемлемые составляющие в приемлемых концентрациях. Например, композиция обычно содержит Fc-EPO белок в концентрации от 0,2 до 10 мг/мл, более предпочтительно от 0,5 до 6 мг/мл.

Буферные компоненты включают любые физиологически приемлемые вещества, которые являются способными регулировать pH, такие, как например, цитратные соли, ацетатные соли, соли гистидина, сукцинатные соли, малеатные соли, фосфатные соли, лактатные соли, их соответствующие кислоты или основания или их смеси. Буферные компоненты, которые обычно используются, представляют собой цитратные соли и/или свободную лимонную кислоту. Композиция обычно включает буферный компонент в концентрации от 10 до 100

ммоль/л, предпочтительно от 2 до 20 ммоль/л, особенно предпочтительно приблизительно 10 ммоль/л.

5 Сурфактанты для Fc-ЕРО композиций могут представлять собой любой наполнитель, обычно используемый в фармацевтических препаратах, предпочтительно эстераы полиэтиленсорбита (различные виды Твина®), такие, как
 10 полиоксиэтилен(20)сорбитмонолаурат, полиоксиэтилен(20)сорбитмонопальмитат и полиоксиэтилен(20)сорбитмоностеарат, а также сополимеры полиоксиэтилена-полиоксипропилена. Композиция обычно содержит сурфактант в количестве от
 15 0,001 вес.% до 1,0 вес.%, предпочтительно от 0,005 до 0,1 вес.%, более предпочтительно от 0,01 до 0,5 вес.%.

20 Композиция также может содержать одну или более аминокислот. Приемлемые аминокислоты включают, но не ограничены, аргинин, гистидин, орнитин, лизин, глицин, метионин, изолейцин, лейцин, аланин, фенилаланин, тирозин и тритофан. В одном воплощении композиция Fc-ЕРО содержит глицин. Предпочтительно, когда аминокислоты используются в форме солей, 25 например, солей хлористоводородной кислоты. Используемые концентрации аминокислот колеблются в пределах от 2 до 200 ммоль/л или от 50 до 150 ммоль.

30 Дополнительно композиция может содержать сахар, такой как сахароза, трегалоза, сорбит; антиоксиданты, такие, как аскорбиновая кислота или глутатион; консерванты, такие, как фенол, м-крезол, метил- или пропилпарабен; хлорбутанол; тиомерсал; хлорид бензалкония; полиэтиленгликоли; 35 циклодекстрины и другие приемлемые компоненты.

40 Является желательным, чтобы Fc-ЕРО композиция была изотоничной. Например, осмоляльность может колебаться в интервале от 150 до 450 мОсмол/кг. Фармацевтические композиции должны быть стабильными в течение желаемого срока годности при хранении при желаемых температурах хранения, таких как 2-8°C или при комнатной температуре. Полезные композиции, 45 содержащие Fc-ЕРО белок, являются хорошо переносимыми, их легко можно приготовить, они могут быть точно отмеряны, а также являются стабильными при хранении при температуре 2°C - 8°C или 25°C, во время многочисленных циклов замораживания-оттаивания и рот механическом стрессе, а также при 50 других видах стресса, таких как хранение в течение, по крайней мере, 3 месяцев при температуре 40°C. Стабильность Fc-ЕРО композиций может быть

проанализирована в стрессовом анализе. Пример стрессового анализа описан в Примере 13.

Введение

5 Терапевтические композиции, содержащие Fc-ЕРО слитые белки, полученные в соответствии с настоящим изобретением, могут вводиться 10 мlekопитающему хозяину любым способом. Таким образом, приемлемый путь введения может быть пероральным или парентеральным (например, внутривенным, внутриартериальным, подкожным, внутримышечным), включая 15 внутривенный и интраперitoneальный пути введения. В дополнение к этому, введение можно осуществлять с помощью периодических введений таблеток терапевтического средства или можно осуществлять непрерывно путем 20 внутривенного или интраперitoneального введения из резервуара, который является внешним (например, внутривенного баллона). То есть, некоторые воплощения соответствуют стандартам чистоты и контроля качества, необходимым для введения человеку. Ветеринарные применения также 25 включены в понятие, которое используется в данной заявке.

25 Композиции, предназначенные как для ветеринарного, так и для медицинского применения терапевтических средств в соответствии с настоящим изобретением, типично включают такие терапевтические средства в сочетании с 30 фармацевтически приемлемым носителем и необязательно с другим(и) ингредиентом(ами). Носитель(и) может(могут) быть приемлемым(и) в смысле совместимости с другими ингредиентами композиции и не является (являются) 35 вредным(и) для реципиента. В этой связи фармацевтически приемлемые носители предназначены для включения любого или всех растворителей, дисперсионной среды, покрытий, антибактериальных и противогрибковых 40 агентов, изотонических агентов и агентов, замедляющих поглощенис, и тому подобных, совместимых с фармацевтическим введением. Применение таких сред 45 и агентов для фармацевтически активных веществ является хорошо известным в области техники. Предполагается использование любой традиционной среды или агента до тех пор, пока они являются совместимым с активным соединением, 50 использование которого предполагается в композиции. Дополнительные активные соединения также могут быть введены в композиции. Композиции могут традиционно присутствовать в единичной дозированной форме и могут быть получены с помощью любых способов, хорошо известных в области

5 фармакологии/микробиологии. В общем случае некоторые композиции готовят путем введения терапевтического средства в сочетание с жидким носителем или тонко измельченным твердым носителем или обоими, а потом, в случае необходимости, рецептируют продукт в желаемую форму композиции.

10 Фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением рецептируется таким образом, чтобы быть совместимой с путем введения. Примеры способов введения включают парентеральное, например, внутривенное, интрадермальное, подкожное, пероральное (например, путем ингаляции), трансдермальное (местное), введение через слизистую оболочку или 15 ректальное введение. Растворы или сусpenзии, используемые для парентерального, интрадермального или подкожного применения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой, как вода для инъекций, физиологический раствор, жирные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие, как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие, как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; 20 хелатирующие агенты, такие, как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие, как ацетатный, цитратный или фосфатный, а также агенты для доводки тоничности, такие, как хлорид натрия или декстроза.

25 Предпочтительный способ для введения Fc-ЕРО белковых продуктов в соответствии с изобретением представляет собой парентеральный (например, внутривенный, внутримышечный, подкожный или интраперитонеальный) путь, при этом вводимые композиции будут, как правило, включать терапевтически эффективные количества продукта в комбинации с приемлемыми разбавителями, носителями и/или вспомогательными веществами. Эффективные дозы, как предполагается, будут существенно варьировать в зависимости от состояния, подвергаемого лечению, однако терапевтические дозы, как предполагается в настоящее время, будут находиться в интервале от 0,2 до 2 мкг активного материала /кг веса тела. Стандартные разбавители, такие как 30 человеческий сывороточный альбумин, предполагаются для применения в фармацевтических композициях в соответствии с изобретением, в качестве стандартного носителя используется физиологический раствор. 35 Вспомогательные материалы, приемлемые для использования в соответствии с изобретением, включают соединения, которые независимо выявляют 40 45 50

стимуляторные эффекты в отношении эритропоэза, такие как тестостероны, стимуляторы клеток предшественников, инсулиноподобный фактор роста, простагландины, серотонин, циклическую АМР, пролактин и трийодтиронин, а также агенты, которые обычно используются при лечении апластической анемии, такие как метенолен, станозолол и нандролон. Смотри, например, Resegotti, *и др.* (1981), Panminerva Medics, 23, 243-248; McGonigle, *и др.*, (1984) Kidney Int., 25(2), 437-444; Pavlovic-Kantera, *и др.*, (1980) Expt. Hematol., 8 (Supp. 8), 283-291; и Kurtz, (1982) FEBS Letters, 14a (l), 105-108.

Также предполагаемыми в качестве вспомогательных веществ являются вещества, которые описаны как такие, которые способствуют эффектам Fc-ЕРО или оказывают на них синергетическое воздействие, например адренергические агонисты, гормоны щитовидной железы, андрогены и ВРА, а также классы соединений, которые обозначаются как «печеночные факторы эритропоэза» (смотри Naughton *и др.*, (1983) Acta Haemat., 69, 171-179) и «эритропины» как описано Congote *и др.* в Abstract 364, Proceedings 7th International Congress of Endocrinology, Quebec City, Quebec, Jul. 1-7, 1984; Congote (1983), Biochem. Biophys. Res. Comm., 115(2), 447-483; и Congote, (1984), Anal. Biochem., 140, 428-433, и «эритрогенины», как описано у Rothman, *и др.*, (1982), J. Surg. Oncol. 20, 105-108.

Полезные растворы для перорального или парентерального введения могут быть получены с помощью любого из способов, которые хорошо известны в области фармацевтики, и являются описанными, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, (Gennaro, A., ред.), Mack Pub., 1990. Композиции для парентерального введения также могут включать гликохолат для buccalного введения, метоксисалицилат для ректального введения или лимонную кислоту для вагинального введения. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы из стекла или пластика. Суппозитории для ректального введения также могут быть получены путем перемешивания лекарственного средства с наполнителем, который не вызывает раздражения, таким, как масло какао, другими глицериды или другими композициями, которые являются твердыми при комнатной температуре и жидкими при температуре тела. Композиции также могут включать, например, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения, гидрогенизированные нафталины и тому подобное. Композиции

для непосредственного введения могут включать глицерин и другие композиции с высокой вязкостью. Другие потенциально полезные парентеральные носители для терапевтических средств включают частицы сополимера этилена и винилацетата, осмотические насосы, имплантируемые инфузионные системы и липосомы. Композиции для введения путем ингаляции могут содержать наполнители, например, лактозу, или могут представлять собой водные растворы, содержащие, например, полиоксиэтилен-9-лауриловый этер, гликохолат и дезоксихолат или масляные растворы для введения в форме капель для носа, или в виде геля, который применяется интраназально. Удерживающие клизмы могут использоваться для ректальной доставки.

Фармацевтические композиции, приемлемые для использования в виде инъекций, включают стерильные водные растворы (где вода выступает в качестве растворителя) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекции непосредственно перед введением. Для внутривенного введения приемлемые носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, ELTM (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатный буферный раствор (PBS). Во всех случаях композиция может быть стерильной и может быть жидкой до такой степени, что существует возможность ее легкого введения с помощью шприца. Она может быть стабильной при условиях производства и хранения и может предохраняться от контаминирующего воздействия микроорганизмов, таких, как бактерии и грибки. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное) и их приемлемые смеси. Собственная текучесть может поддерживаться, например, при использовании покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии, или при использовании сурфактантов. Предотвращение действия организмов может быть достигнуто с помощью различных антибактериальных агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тиомерсала и тому подобное. Во многих случаях будет желательным включать изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит и хлорид натрия, в композицию. Пролонгированная абсорбция инъецируемых композиций может осуществляться

при включении в композиции агента, который задерживает абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

5 Стерильные инъецируемые растворы могут быть получены путем введения активного соединения в требуемом количестве в приемлемый растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, если это является необходимым, после чего осуществляют стерилизацию фильтрованием. В общем 10 случае дисперсии получают путем введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые 15 другие ингредиенты из тех, которые перечислены выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъецируемых растворов способы 20 получения включают высушивание в вакууме и сублимационную сушку, что обеспечивает получение порошка активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент, полученный из его стерильно профильтрованного раствора.

25 В одном воплощении терапевтические средства получают вместе с носителями, которые обеспечивают защиту от быстрого выведения из организма, примером таких является композиция контролируемого высвобождения, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Могут 30 использоваться биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие, как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэстры и полимолочная кислота. Способы получения таких композиций 35 будут понятны для специалиста в данной области. Материалы также могут быть получены коммерческим путем от Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Суспензии липосом также могут использоваться в качестве фармацевтически 40 приемлемых носителей. Таковые могут быть получены в соответствии со способами, известными специалисту в данной области, например, так, как описано в патенте США № 4,522,811. Также могут использоваться микросомы и микрочастицы.

45 Оральные или парентеральные композиции могут быть рецептированы в форме единичной дозы для легкого введения и однородности дозирования. Единичные дозированные формы относятся к физически дискретным единицам, 50 пригодным в качестве единичных дозированных форм для индивидуума, которого подвергают лечению; при этом каждая единичная доза содержит предварительно определенное количество активного соединения, подсчитанное

для обеспечения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Определенная характеристика форм единичной дозы в соответствии с изобретением продиктована уникальными характеристиками активного соединения и определенным достигаемым терапевтическим эффектом, а также ограничениями, существующими в области техники, в отношении смешивания такого активного соединения для лечения индивидуума, или непосредственно зависит от этих факторов.

Определение терапевтически эффективного количества Fc-EPO и частота дозировки

В общем случае терапевтические средства, содержащие Fc-EPO слитые белки, полученные в соответствии с настоящим изобретением, могут быть рецептированы для парентерального или орального введения человеку или другим млекопитающим, например, в терапевтически эффективных количествах, то есть количествах, которые обеспечивают приемлемые концентрации лекарственного средства в целевой ткани в течение времени, достаточного для индукции желаемого эффекта. В частности, как используется в данной заявке, термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству Fc-EPO слитых белков, которое обеспечивает повышение значения гематокрита до желаемого гематокрита или желаемого интервала гематокрита, обеспечивающего преимущества для пациента или, альтернативно, поддерживающего у пациента уровень желаемого гематокрита или уровень в пределах определенного интервала гематокрита. Количество будет варьировать от одного индивидуума до другого и будет зависеть от ряда факторов, включая общее физическое состояние пациента, тяжести причины, лежащей в основе анемии, и окончательного желаемого уровня гематокрита для индивидуального пациента. Желаемый гематокрит обычно составляет приблизительно 30%, или пребывает в интервале от 30% до 38%, предпочтительно выше 38% и более предпочтительно 40%-45%. Общие руководства, касающиеся интервалов желаемого гематокрита для rHuEpo, могут быть найдены в рекламном вкладыше для EPOGEN®, датированном 23.12.1996, они составляют 30%-36% или альтернативно 32%-38%, как установлено в данном рекламном вкладыше. При этом понятно, что такие желаемые уровни будут варьировать от одного индивидуума до другого так, что лечащий врач должен быть внимателен при

5 определении целевого уровня гематокрита для любого данного пациента. Несмотря на это определение желаемого уровня гематокрита находится в пределах компетенции специалиста в данной области.

10 Терапевтически эффективное количество Fc-ЕРО белка может быть легко установлено специалистом в данной области. Пример 15 представляет 15 клиническую пропись, которая имеет целью определить терапевтически эффективное количество Fc-ЕРО, вводимого в соответствии со схемой дозировки один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц. Например, интервал доз для введения один раз в неделю или один раз в две недели составляет от приблизительно 0,075 до приблизительно 4,5 мкг Fc-ЕРО на кг, на дозу. Интервалы доз для приема в соответствии со схемой один раз в месяц составляют от 0,45 до 4,5 мкг Fc- на кг, на дозу.

20 Эффективная концентрация Fc-ЕРО слитых белков в соответствии с изобретением, которая доставляется в терапевтической композиции, будет 25 варьировать в зависимости от ряда факторов, в том числе заключительной желаемой дозировки лекарственного средства, которое вводиться, и способа 30 введения. Предпочтительная дозировка, которая вводиться, также, вероятно, будет зависеть от таких переменных, как тип и тяжесть заболевания или 35 показания, которые подвергаются лечению, от общего состояния здоровья определенного пациента, от относительной биологической эффективности (например, уровня сиалирирования) доставляемого терапевтического средства, а также способа введения. В некоторых воплощениях терапевтические средства в 40 соответствии с изобретением могут обеспечиваться для индивидуума при использовании типичных единичных доз, дедуцированных из изучений млекопитающих при использовании отличных от человека приматов, а также 45 грызунов. Как описано выше, единичная доза относится к унитарной дозе, которая является приемлемой для введения пациенту, и которую легко подвергать обработке и упаковывать, остается физически и биологически стабильной единичной дозой, включающей либо терапевтические средства как таковые, либо их смесь с твердыми или жидкими фармацевтическими 50 разбавителями или носителями.

Частота дозирования для терапевтического средства, содержащего Fc-ЕРО слитый белок, будет варьировать в зависимости от состояния, которое подвергают лечению, и целевого гематокрита, но в общем случае будет

меньшей, чем три раза в неделю. Частота дозирования может быть приблизительно один или два раза в неделю. Частота дозирования может быть также меньшей, чем приблизительно один раз в неделю, например, 5 приблизительно один раз каждые две недели (приблизительно один раз в 14 дней), один раз в месяц или один раз в два месяца. При этом понятно, что частота дозирования, которая обычно используется, может варьировать до 10 некоторой степени от частоты, раскрытой в данной заявке благодаря вариациям ответов, выявляемых различными индивидуумами на эритропоэтин и его аналоги; при этом термин «приблизительно» предназначен для отражения таких 15 вариаций.

Изобретение также обеспечивает терапевтически эффективные количества 20 железа для введения для того, чтобы поддержать повышенный эритропоэз в процессе терапии. Количество, которое назначается, может быть легко определено специалистом в данной области на основе терапии с помощью 25 rHuEpo. Дополнительно к этому, терапевтические средства в соответствии с настоящим изобретением могут вводиться самостоятельно или в комбинации с 30 другими молекулами, известными как такие, которые имеют благоприятное воздействие на частное заболевание или симптом, представляющий интерес. В качестве примера можно сказать, что полезные кофакторы включают кофакторы, облегчающие симптом, в том числе антисептики, антибиотики, противовирусные 35 и противогрибковые агенты, а также анальгетики и средства для анестезии.

Пролекарственная форма

Терапевтические средства в соответствии с изобретением также включают 35 «пролекарственные» производные. Термин «пролекарственная форма» относится к фармакологически неактивной (или частично неактивной) производной 40 исходной молекулы, которая требует биотрансформации, либо спонтанной, либо ферментативной, в организме для высвобождения или активации активного компонента. Пролекарственные формы представляют собой варианты или 45 производные терапевтических средств в соответствии с изобретением, которые являются фармацевтически активными *in vivo*, когда они подвергаются сольволизу при физиологических условиях или подвергаются ферментативному 50 разложению. Пролекарственная форма в соответствии с изобретением может называться одинарной, двойной, тройной и так далее, в зависимости от числа этапов биотрансформации, которые необходимы для высвобождения или

активации активного лекарственного компонента в организме, что отражает
 5 число функциональностей, присутствующих в форме определенного типа
 предшественника. Пролекарственные формы часто обеспечивают преимущества
 в отношении растворимости, совместимости с тканями или отсроченного
 высвобождения в организме млекопитающего (смотри, Bundgard. (1985) Design
 10 of Prodrugs, стр. 7-9, 21-24, Elsevier, Amsterdam; Silverman, (1992) The Organic
Chemistry of Drug Design и Drug Action, стр. 352-401, Academic Press, San Diego,
 Calif.). Более того, пролекарственные производные в соответствии с настоящим
 15 изобретением могут сочетаться с другими характеристиками для повышения
 биодоступности.

In vivo экспрессия

Fc-ЕРО слитый белок в соответствии с настоящим изобретением может
 20 обеспечиваться с помощью способов экспрессии *in vivo*. Например, нуклеиновая
 кислота, кодирующая Fc-ЕРО слитый белок, может преимущественно
 обеспечиваться непосредственно для пациента, страдающего расстройством
 гематопоэза или гематопоэтической недостаточностью, или может
 25 обеспечиваться клеткой *ex vivo* после введения живой клетки пациенту. Способы
in vivo генной терапии, известные в данной области техники, включают
 30 обеспечение очищенной ДНК (например, в плазмиде), обеспечение ДНК,
 содержащейся в вирусном векторе или обеспечение ДНК в липосоме или другом
 35 носителе (смотри, например, патент США № 5,827,703, который раскрывает
 липидные носители для применения в генной терапии, и патент США №
 6,281,010, обеспечивающий аденоовирусные векторы, полезные в генной
 40 терапии).

Способы лечения заболевания путем имплантирования клетки, которая
 45 была модифицирована для экспрессии рекомбинантного белка, являются также
 известными. Смотри, например, патент США № 5,399,346, который раскрывает
 способы введения нуклеиновой кислоты в первичную клетку человека для
 50 введения человеку.

45 *In vivo* экспрессионные способы являются особенно полезными для
 доставки белка непосредственно в целевые ткани или клеточный компартмент
 без очистки. В настоящем изобретении генная терапия при использовании
 50 последовательности, кодирующей Fc-ЕРО, может найти применение при
 различных болезненных состояниях, расстройствах и состояниях

5 гематологических нарушений, в том числе при анемии, в частности, для лечения типа анемии, ассоциированного с хронической почечной недостаточностью, и подобных. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc-ЕРО слитый белок, может быть инсертирована в приемлемую транскрипционную или экспрессионную кассету и введена в хозяйский организм млекопитающего в виде ДНК без оболочки или в виде комплекса с приемлемым носителем.

10 Мониторинг продукции активного Fc-ЕРО белка может быть осуществлен с помощью гибридизации нуклеиновой кислоты, ELISA, Вестерн-гибридизации, а также с помощью других приемлемых способов, известных среднему

15 специалисту в данной области техники.

Было обнаружено, что множество тканей организма может быть трансформировано при использовании системного введения трансгенов. Экспрессия экзогенной ДНК после внутривенной инъекции катионного липидного носителя/комплекса экзогенной ДНК в млекопитающего хозяина была продемонстрирована во многих тканях, включая Т-лимфоциты, 20 ретикулоэндотелиальную систему, клетки сердечного эндотелия, клетки легких и клетки костного мозга, например, гематopoэтические клетки, полученные из 25 костного мозга.

Технология генной терапевтической доставки *in vivo*, как описано в патенте 30 США № 6,627,615, является нетоксической у животных, а трансгенная экспрессия, как было показано, длиться в течение, по крайней мере, 60 дней после единичного введения. Трансген, как выяснилось, не интегрирует в ДНК 35 хозяйской клетки на определяемых уровнях *in vivo*, как измеряется с помощью Саузерн анализа, что дает возможность предположить, что эта методика для генной терапии не будет создавать проблем для млекопитающего хозяина путем 40 изменения экспрессии нормальных клеточных генов, активирующих онкогены, вызывающие рак, или выключать гены, супрессирующие опухоль, которые предотвращают развитие рака.

ПРИМЕРЫ

45 Пример 1. Конструкции, кодирующие Fc-ЕРО слитые белки

Плазмида phC10-Fcg2h(FN → AQ)-M1-EPO, кодирующая Fc-ЕРО слитый белок, содержащий нормальную эритропоэтиновую часть, и плазмида phC10-Fcg2h(FN → AQ)-M1-EPO(NDS), кодирующая Fc-ЕРО слитый белок с NDS 50 мутациями, были сконструированы так, как описано ниже.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая эритропоэтин человека, была оптимизирована в отношении кодонов для высокой экспрессии в клетках млекопитающих. Например, SEQ ID NO: 3 показывает пример кодирующих последовательностей зрелого эритропоэтина человека с модифицированными кодонами для оптимизации трансляции. Последовательность 5'-конца была также модифицирована для включения Sma I 10 сайта для совершенствования субклонирования.

SEQ ID NO: 3

15 CCCGGGtGCCCCACCACGCCTCATCTGTGACAGCCGAGTgCTGGAGAGGTAC
 GCAGCTTGAATGAGAACATCACcGTgCCtGACACCAAAGTgAATTCTATGCCT
 GGAAGAGGATGGAGGTtGGcCAGCAGGCCGTAGAAGTgTGGCAGGGCCTGGC
 20 CCTGCTGTCGGAAGCTGTCCTGCGGGGCCAGGCCCTGTTGGTCAACTCTTCC
 CAGCCGTGGGAGCCCTGCAaCTGCATGTGGATAAAGCCGTgAGTGGCCTTC
 GCAGCCTCACCACTCTGCTCAGCTGCTCCcCTCCGcACAATCACTGCTGACACTT
 25 CCCTCCAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCcCTCCGcACAATCACTGCTGACACTT
 TCCGCAAACCTTTCCGAGTCTACTCCAATTCCCTCCGGGAAAGCTGAAGCT
 GTACACAGGGGAGGCCTgcCGGACAGGGACAGATGActcgag

30 (Маленькие буквы обозначают отличия от оснований в кодирующей последовательности эритропоэтина человека дикого типа. Изменения предсказаны для повышения уровня экспрессии в клетках млекопитающего, но не для изменения экспрессируемой белковой последовательности).

35 NDS мутации были введены в эритропоэтиновую часть с помощью сайт-направленного мутагенеза так, как описано в публикации PCT WO 01/36489, раскрытие которой введено в данную заявку в качестве ссылки. Например, использовали Xma I-Xho I фрагмент ДНК, содержащий форму кодирующей 40 последовательности эритропоэтина человека с мутациями, приводящими к получению замен His32Gly, Cys33Pro, Trp88Cys и Pro90Ala, как раскрыто в WO01/36489. Соответствующая белковая последовательность показана в SEQ ID 45 NO: 4.

APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEGPSLNENITVPDTKVNFYAWKRM
 EVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVWSSQPCEGLQLHVDKAVSGLRSLT
 50 TLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLKLYTGEAC
 RTGDR (SEQ ID NO: 4)

5 Гибридную Fc часть, включающую CH2 домен, имеющий происхождение от IgG2, и шарнирный участок, имеющий происхождение от IgG1, конструировали так, как описано в публикации патента США № 20020147311 и, например, в WO 01/058957.

10 Xma I-Xba I фрагмент ДНК, кодирующий форму эритропоэтина, встраивали в плазмидный вектор, например, pdCs-Fc-X, который кодирует измененный шарнирный участок, полученный из IgG1, а также CH2 и CH3 участок, полученный из IgG2, за исключением того, что существовали два набора 15 мутаций (в данной заявке называются M1 набором мутаций), которые приводят к аминокислотным заменам на C-терминальном конце CH3 так, что последовательность в месте соединения C-терминального конца CH3 и N-терминального конца ЕРО является следующей:

20TQKSATATPGA-APPRLI.....(SEQ ID NO: 5)

25 Первый набор мутаций, который изменяет последовательность KSLSLSPG (SEQ ID NO: 6) CH3 участка IgG2 до KSATATPG (SEQ ID NO: 7), раскрыт в WO 02/079232. Эффект замены Leu-Ser-Leu-Ser (от положения 3 до положения 6 SEQ ED NO: 6) на Ala-Thr-Ala-Thr от положения 3 до положения 6 SEQ ED NO: 7) заключается в удалении потенциального эпитопа, не принадлежащего Т-клеткам 30 человека, который может возникать по причине того, что соединение между Fc человека и эритропоэтином человека содержит несобственные пептидные последовательности. Второй набор, состоящий из замены одной аминокислоты K на A в C-терминальной аминокислоте участка CH3, раскрыт в WO 01/58957.

35 Экспрессионный вектор pdCs-Fc-X для экспрессии Fc слитых белков был описан Lo *и др.*, (1998) Protein Engineering 11: 495. Плазмиду phC1O-Fc-X конструировали из pdCs-Fc-X путем замены кодирующего участка гена 40 дигидрофолатредуктазы (DHFR), сообщающего устойчивость к метотрексату на ген, сообщающий устойчивость к гигромицину B. Nhe I/Nsi I гигромицин B фрагмент ДНК получали с помощью ПЦР амплификации гена гигромицина B, полученного из матричной плазмиды pCEP4 (Invitrogen) при использовании 45 праймеров 5'-GCTAGCTTGGTGCCTCATGAAAAAGCCTGAACTC-3' (SEQ ID NO: 8) и 5'-ATGCATTCAGTTAGCCTCCCCCATC-3' (SEQ ID NO: 9). ПЦР фрагмент клонировали в TA клонирующий вектор pCR2.1 (Invitrogen), и 50 подтверждали его последовательность.

Плазмиду phC10-Fcg2h-M1-EPO(NDS) получали путем тройного лигирования Nhe I/AfI I и Afl II/Nsi I фрагментов ДНК из pdCs-Fcg2h-M1-EPO(NDS) и Nhe I/Nse I гигромицин В фрагмента.

Дополнительно, мутации, которые приводят к двойной аминокислотной замене «FN > AQ», в пределах аминокислотной последовательности Gln-Phe-Asn-Ser в CH2 домене тяжелой цепи IgG2, которая устраняет потенциальный эпитоп Т-клеток и N-связанный сайт гликозилирования в Fc части, вводили с помощью ПЦР мутагенеза. Мутагенные праймеры 5'-AGCAGGCCAGAGCACGTTCCGTGTGGT-3' (SEQ ID NO: 10) и 5'-GAACGTGCTCTGGGCCTGCTCCTCCCGT-3' (SEQ ID NO: 11) соответственно спаривали с расположенным ниже праймером, содержащим Sac II сайт 5'-CCCCGCGGGTCCCACCTTGG-3' (SEQ ID NO: 12) и расположенным выше праймером, содержащим Pvu II сайт 5'-CCCAGCTGGGTGCTGACACGT-3' (SEQ ID NO: 13), и два перекрывающихся фрагмента ДНК амплифицировали из матрицы ДНК pdC10-Fcg2h-M1-EPO(NDS). Во втором цикле амплификации Pvu II/Sac II фрагмент, содержащий мутацию (FN- → AQ) амплифицировали при использовании расположенного выше праймера (SEQ ID NO: 13) и расположенного ниже праймера (SEQ ID NO: 12) из продуктов ПЦР, полученных в первом цикле амплификации. Фрагмент Pvu II/Sac II клонировали в ТА вектор pCR2.1 (Invitrogen) и проверяли его последовательность. Конструкцию pdC10-Fcg2h(FN > AQ)-M1-EPO(NDS) получали из тройного лигирования Pvu II/Sac II фрагмента, Xho I/Sac II фрагмента из pdC10-Fcg2h-M1-EPO и Xho I/Pvu II фрагмента из pdC10-Fcg2h-M1-EPO(NDS).

Для введения FN > AQ мутации в плазмиду phC10-Fcg2h-M1-EPO соединяли приемлемые фрагменты ДНК из phC10-Fcg2h-M1-EPO и из pdC10-Fcg2h(FN → AQ)-M1-EPO. Обе конструкции phC10-Fcg2h-M1-EPO и pdC10-Fcg2h(FN → AQ)-M1-EPO переваривали с помощью Xho I и Xba I, а фрагмент размером 5,7 кб Xho I/Xba I phC10-Fcg2h-M1-EPO(NDS) лигировали с фрагментом размером 1,9 кб pdC10-Fcg2h(FN → AQ)-M1-EPO, получая при этом phC10-Fcg2h(FN → AQ)-M1-EPO.

Для введения мутации FN → AQ в плазмиду phC10-Fcg2h-M1-EPO(NDS) два приемлемых Xho I/Sma I переваренных фрагмента из phC10-Fcg2h-M1-EPO(NDS) и из phC10-Fcg2h(FN → AQ)-M1-EPO лигировали вместе, получая при этом phC10-Fcg2h(FN → AQ)-M1-EPO(NDS).

Аминокислотная последовательность Fc-EPO, кодируемая pdC10-huFc2h(FN → AQ)-M1-EPO, показана в SEQ ID NO: 14.

5 EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDE
 VOFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQAQSTFRWSVLTWHQDWLNGKEYKCKVSN
 KGLPAPIEKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 10 SNGQPENNYKTPPMULDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALWHYTQK
SATATPGAAVPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNF
YAWKRMMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAV
SGLRSLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLK
 15 LYTGEACRTGDR (SEQ ID NO: 14)

Аминокислотная последовательность Fc-EPO(NDS), кодируемая pdC10-huFc2h(FN → AQ)-M1-EPO(NDS), показана в SEQ ID NO: 15.

20 EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDE
 VOFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQAQSTFRWSVLTWHQDWLNGKEYKCKVSN
 KGLPAPIEKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 25 SNGQPENNYKTPPMULDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSATATPGAAAPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEGPSLNENITVPDTKVNF
YAWKRMMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPCEALQLHVDKAV
SGLRSLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLK
 30 LYTGEACRTGDR (SEQ ID NO: 15)

Подчеркнутая последовательность представляют собой EPO часть, подчеркнутая двойной чертой последовательность представляют собой IgG1 шарнирный участок, а неподчеркнутая последовательность представляет собой CH2 и CH3 домены модифицированной цепи IgG, в которой указанная курсивом последовательность представляет собой CH3 домен.

Пример 2. Экспрессия Fc-EPO в различных линиях клеток

40 Для быстрого анализа слитого белка плазмида phC10-Fcg2h(FN → AQ)-M1-EPO(NDS) или phC10-Fcg2h(FN → AQ)-M1-EPO вводили в приемлемую культуру клеток с помощью стандартных способов трансфекции, таких как, 45 например, опосредованная фосфатом кальция копреципитация ДНК (Sambrook *et al.*, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2-ое изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press) или посредством липофекции при использовании 50 Липофектамина Плюс (Life Technologies) в соответствии с прописями производителя.

Для того чтобы получить стабильно трансфицированные ВНК-21 клетки, плазмиду pHClO-Fcg2h(FN → AQ)-M1-EPO(NDS) или pHCl10-Fcg2h(FN → AQ)-M1-EPO вводили в ВНК-21 клетки путем электропорации. Для высоко 5 эффективной электропорации ВНК-21 клетки, выращенные в среде МЕМ (дополненной неосновными аминокислотами и пируватом натрия, как рекомендовано Американской Коллекцией Типовых Культур (ATCC)), 10 промывали один раз с помощью ФБР, и приблизительно 5×10^6 клеток ресуспендировали в 0,5 мл ФБР и инкубировали с 10 мкг линеаризованной ДНК плазмиды в кюветте Gene Pulser™ (0,4 см электродная щель, BioRad) на льду в 15 течение 10 мин. Электропорацию осуществляли при использовании Gene Pulser™ (BioRad, Hercules, CA) с параметрами 0,25 В и 500 мкФ. Клетки оставляли для восстановления в течение 10 мин. на льду, после чего их 20 ресуспендировали в ростовой среде и высаживали на планшеты на 96 ячеек. Гигромицин В (Hyg В) прибавляли к ростовой среде через два дня после 25 трансфекции при концентрации 300 микрограмм/мл. Клетки подпитывали каждые три дня от одного до трех раз, резистентные к Hyg В стабильные клоны появлялись спустя 2 - 3 недели.

Для идентификации стабильных клонов, продуцирующих высокие уровни Fc-EPO слитого белка, супернатанты, полученные из клонов, анализировали с 30 помощью ELISA с Fc-антителами. Клоны, имеющие высокие показатели продукции, изолировали и размножали в ростовой среде, содержащей 300 микрограмм/мл Hyg В. С целью продукции белка клетки ВНК-21 обычным 35 образом выращивали на среде DMEM/F-12 с добавками или использовали другую приемлемую среду, такую как VP-SFM (Life Technologies). Fc-EPO слитый белок собирали из кондиционной среды с помощью стандартной фильтрации при нормальной скорости истечения, а очищенный материал 40 хранили при 4 градусах Цельсия до последующей очистки. Обычно при использовании способа с вращающимися фляконами из клеток ВНК-21 получали 6 - 12 мкг/мл Fc-EPO белка.

45 Fc-EPO слитые белки также экспрессировали и восстанавливали из NS/0. NS/0 клоны, стабильно поддерживающие плазмиду pdCl10-Fcg2h(FN → AQ)-M1-EPO или pdCl10-Fcg2h(FN → AQ)-M1-EPO(NDS), получали посредством 50 способов, которые ранее были описаны в РСТ публикации WO 01/36489, полное

раскрытие которых хранено в данную заявку в качестве ссылки. Обычно из клеток NS/0 получали 50 - 100 мкг/мл Fc-ЕРО белка.

Пример 3. Адаптация клеток ВНК для роста в супензии и/или среде, не содержащей белка

ВНК представляет собой прикрепленную линию клеток, которая обычно выращивается на среде, содержащей сыворотку, на такой, как, например, МЕМ + 10 % инактивированная прогревание плодная сыворотка теленка (FBS). Для поддержания и размножения ВНК клеток их периодически (например, с интервалами 4 дня) отделяли от их субстрата, обычно посредством воздействия раствора трипсин-ЭДТА, разводили свежей средой, и повторно засевали ими приемлемые сосуды. Однако клетки ВНК могут быть адаптированы к росту в супензии и в среде, не содержащей сыворотки, и/или в среде, не содержащей белка, с помощью следующих процедур.

При осуществлении типичного адаптационного процесса ВНК клетки сначала культивировали в 75:25 (об./об.) смеси МЕМ + FBS : целевая среда до достижения фазы экспоненциального роста и последовательно 25 субкультивировали при приемлемом значении плотности клеток в 50:50 (об./об.), 25:75 (об./об.), и в завершение, 0:100 (об./об.) смеси исходная среда : целевая среда. При осуществлении процесса адаптации рост ВНК клеток 30 подвергали мониторингу при визуальном наблюдении. Следующие среды, не содержащие сыворотки, анализировали для адаптации: 293 SFM H (Invitrogen Corp., cat # 11686-929), CHO-S-SFMII (Invitrogen Corp., cat # 12052-098), VP-SFM (Invitrogen Corp., cat # 11681-020), Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp., cat # 12309), 35 CD Hybridoma (Invitrogen Corp., cat # 11279-023) и H-SFM (Invitrogen Corp., cat # 12045-076).

Для перехода ВНК клеток от прикрепленной линии клеток к супензионной 40 линии клеток в процессе адаптационного процесса смеси культур оставляли для осаждения перед каждым пассажем и верхние 25% клеточной супензии удаляли и разводили в свежей среде. Поскольку клетки, которые агрегировали, 45 осаждались на дне сосудов для культивирования быстрее, чем одиночные клетки и дублеты клеток, верхние 25% клеточной супензии обычно содержали те клетки, которые демонстрируют наименьший уровень агрегации. Таким образом, 50 каждый пассаж предполагал размножение и обогащение ВНК клетками,

наименее склонными к агрегации, с помощью такого способа получали супензионные клоны линии клеток BHK, экспрессирующие Fc-EPO белки.

Было обнаружено, что можно получить BHK клетки, экспрессирующие Fc-EPO белки, которые являются адаптированными для роста в средах VP-SFM или Opti-PRO SFM, не содержащих сыворотки, или можно получить супензионные культуры BHK клеток. BHK клетки, экспрессирующие Fc-EPO слитые белки, не были способными к росту в следующих средах, не содержащих сыворотки: 293 SFM II, CHO-S-SFM II, CD Hybridoma и H-SFM.

BHK клетки, адаптированные для роста в среде, не содержащей сыворотки, VP-SFM, были в дальнейшем адаптированы для роста в среде, не содержащей белка, например, DMEM/F-12 (Invitrogen Corp., cat # 11039-021) путем последовательного культивирования BHK клеток при приемлемой плотности клеток в 75:25 (об./об.), 50:50 (об./об.), 25:75 (об./об.) и, в завершение, 0:100 (об./об.) смеси VP-SFM : DMEM/F-12. Не содержащую белка среду DMEM/F-12 дополняли глутамином (заключительное содержание - 6 mM), 2 г/л HyPep 4601 (Quest International, Chicago, IL, cat # 5Z10419), 2 г/л HyPep 1510 (Quest International, Chicago, IL, cat # 5X59053), 10 мкл/л (об./об.) этаноламина (Sigma, cat # E0135) и 5 мкМ Трополона (Sigma, cat # T7387). С помощью этого способа получали линию клеток BHK, стабильно экспрессирующую Fc-EPO слитый белок, способную расти в дополненной среде DMEM/F-12, а также способную поддерживать высокий уровень жизнеспособности клеток.

Пример 4. Очистка и характеристика белка в агрегированном состоянии

Для анализа Fc-EPO слитые белки очищали от супернатантов клеточных культур с помощью Протеин А хроматографии на основе сродства Fc части с Протеином А. Кондиционные супернатанты, полученные из клеток, экспрессирующих Fc-EPO белки, загружали в предварительно уравновешенную Протеин А сефарозную колонку с высокой скоростью истечения. Колонку интенсивно промывали с помощью буфера на основе фосфата натрия (150 mM фосфата натрия, 100 mM NaCl при нейтральном значении pH). Связанный белок элюировали при использовании натрий фосфатного буфера с низким значением pH (pH 2,5 - 3) (состав такой, как описано выше), и элюированные фракции немедленно нейтрализовали.

Для оценки агрегированного состояния Fc-EPO слитых белков, полученных в различных линиях клеток, очищенные с помощью Протеина А образцы

анализировали с помощью аналитической вытеснительной хроматографии (SEC). Образцы подвергали фракционированию с помощью ВЭЖХ-SEC (например, Super 3000 SW, TosoHaas, Montgomeryville, PA) при пятнадцатиминутной прогонке при скорости истечения 0,35 мл/мин. Существенная часть Fc-EPO белков (например, до 90% - 100% от общего выхода), полученных из ВНК клеток, была неагрегированной. Кроме того, образцы Fc-EPO слитых белков, проанализированные с помощью восстанавливающего SDS-ПАГЭ (готовый к употреблению NuPAGE 4% -12% гель заводского изготовления, NuPAGE, Novex) выявили существенно одну полоску, что свидетельствовало о том, что продукты были устойчивыми к деградации при стандартных процедурах обработки.

Fc-EPO слитые белки, очищенные из ВНК клеток, выращенных в суспензии, в среде, не содержащей сыворотки, и/или в среде, не содержащей белка, также подвергали изучению характеристик с помощью SDS-ПАГЭ и аналитической SEC, как описано выше. Белки, как было обнаружено, находились существенно в неагрегированном состоянии, подобно белкам, синтезированным в клетках ВНК, выращенным на среде, содержащей сыворотку.

Пример 5А. Характеристика моделей гликозилирования

Серин126 в человеческом эритропоэтине находится в последовательности, совместимой с О-гликозилированием и является консервативным во всех белках эритропоэтина млекопитающих. Однако серин126 находится в «свисающей петле», которая не является плотно упакованной подобно остальной части белка. При отсутствии О-гликозилирования этот участок эритропоэтина может быть особенно чувствительным к протеолизу.

Состояние О-гликозилирования в Ser126 в Fc-EPO белках, полученных в различных линиях клеток, проверяли при использовании ВЭЖХ с обратной фазой. Образцы подвергали денатурации и восстановлению, разводили в 0,1% трифторуксусной кислоте (ТФУ), и вносили в колонку ВЭЖХ с обратной фазой (например, колонка Vydac C4, Grace Vydac). Использовали градиент в 0,085% ТФУ в ацетонитриле и регистрировали время удержания для образцов белка. Было обнаружено, что Fc-EPO и Fc-g2h(FN → AQ)-EPO, синтезированные в клетках ВНК-21, приводили к образованию двух частично перекрывающихся основных пиков (Пик #1 и Пик #2). Фракции пиков дополнительно анализировали с помощью пептидного картирования. Было обнаружено, что Пик

#1 соответствует форме Fc-EPO, которая была гликозилирована в Ser126, на что указывает отсутствие сигнатурного пептида (Пептида #36), в то время как Пик #2 соответствует форме Fc-EPO, которая не была гликозилирована в Ser126, на что указывает присутствие сигнатурного пептида (Пептида #36). Было обнаружено, что Ser126 является модифицированным с помощью О-гликозилирования приблизительно в 60% молекул, Fc-EPO полученных из клеток BHK, что является последовательным с тем, что было раскрыто для существующего в природе EPO. Кроме того, рост клеток BHK в дополненной среде DMEM/F-12, не содержащей белка, имел позитивное влияние на частоту О-гликозилирования.

Пример 5В. Характеристика моделей сиалирования

Степень сиалирования Fc-EPO слитых белков, синтезированных в клетках NS/0, BHK, 293 и PerC6 сравнивали с помощью изоэлектрического фокусирования (IEF) при использовании гель-электрофореза. Кратко, образцы, сконцентрированные до 2 мг/мл и обессоленные, в случае необходимости, прибавляли к равному объему IEF буфера для образцов pH 3-7, и разгоняли в вертикальном геле Novex pH 3-7 IEF фабричного изготовления (Novex, cat# EC6655B/B2) в течение 2,5 часов, первый час при 100 В, второй час при 200 В и последние 30 минут при 500 В. Гель фиксировали, окрашивали и удаляли краситель.

В одном отдельном эксперименте сравнивали следующие образцы (образцы были получены из клеток, выращенных в среде, содержащей сыворотку):

1. Fcg2h-EPO(NDS) из NS/0
2. Fcg2h-EPO(NDS) из BHK-21
3. Fcg2h-EPO из BHK-21
4. Fcg2h(«Delta Lys»)-EPO из BHK-21
5. Fcg4h(FN → AQ «Delta Lys»)-EPO из BHK-21
6. Fcg4h(«Delta Lys»)-EPO из BHK-21

В этой группе «Delta Lys» относится к делеции лизина на С-терминальном конце Fc домена (образцы 4-6). Образцы 1-3 имели мутацию лизина в этом С-терминальном с образованием аланина. Таким образом, С-терминальный лизин отсутствовал во всех образцах, а также не существовало различия в полученном заряде между образцами. Все клетки выращивали как прикрепленные клетки в среде, не содержащей сыворотки.

Образцы вносили в pH 3-7 IEF гель и сравнивали со стандартами, которые фокусировали при значениях pH 3,5, 4,2, 4,5, 5,2, 5,3, 6,0 и 6,9 (Serva Electrophoresis, Germany). Первый образец, Fcg2h-EPO(NDS) из NS/0, мигрировал в виде распределения полос с изоэлектрическими точками приблизительно pH 5,3 и 6,5; наиболее интенсивные полосы присутствовали при pH 6,0-6,1. Второй образец, Fcg2h-EPO(NDS) из BHK-21, мигрировал в виде распределения интенсивных полос с изоэлектрическими точками приблизительно от pH 4,6 до pH 5,0, со слабыми полосами от pH 5,0 до приблизительно pH 6,0, наиболее интенсивные полосы присутствовали при pH 4,8-4,9. Третий и четвертый образцы, Fcg2h-EPO из BHK-21 и Fcg2h(«Delta Lys»)-EPO из BHK-21, соответственно, оба имели распределение полос от приблизительно pH 4,7 до 6,0 с наиболее интенсивными полосами, сфокусированными при значении pH приблизительно pH 5,3. Пятый и шестой образцы, Fcg4h(FN → AQ «Delta Lys»)-EPO из BHK-21 и Fcg4h(«Delta Lys»)-EPO из BHK-21, соответственно, имели модель фокусирования, подобную таковой для образца, то есть мигрировали как распределение интенсивных полос с изоэлектрическими точками при значениях от приблизительно pH 4,6 до pH 5,0, со слабыми полосами при значениях от pH 5,0 до приблизительно pH 6,0. Эти результаты показывают, что синтез Fc-EPO слитых белков в клетках BHK в общем случае приводит к значительно более кислому продукту, чем идентичные или подобные продукты, синтезированные в клетках NS/0.

В других экспериментах образцы Fcg2h-M1-EPO(NDS) из BHK клеток обрабатывали с помощью нейраминидазы, которая удаляет сиаловую кислоту из олигосахаридов. Полученные образцы, обработанные нейраминидазой, разгоняли в IEF геле и обнаруживали, что они фокусируются в виде нескольких полос при pH 6,9 или более. Когда сравнивали модели полос для образцов, полученных из BHK клеток, с обработкой или без обработки нейраминидазой, и образцы, полученные из клеток NS/0, то идентифицировали приблизительно 27 различных видов сиалирования. Эти 27 видов соответствуют предсказанным 28 различным видам, которые могут быть получены в результате варьирования степени сиалирования Fc-EPO слитых белков в гомодимерной конфигурации. В соответствии с этим анализом Fcg2h-EPO с 4-5 остатками сиаловой кислоты фокусировался с маркером pH 6,9, а Fcg2h-EPO с 11-12 остатками сиаловой кислоты фокусировался с маркером pH 6,0. Было обнаружено, что популяция

5 Fcg2h-EPO белков, синтезированных в клетках BHK, выявляется такой, которая имеет в среднем 21 остаток сиаловой кислоты на молекулу белка. В противовес этому, популяция Fc(g2h)-EPO белков, синтезированных в клетках NS/0, выявлялась такой, которая имеет в среднем приблизительно 10 остатков сиаловой кислоты на молекулу белка.

10 В последующих экспериментах клетки BHK, экспрессирующие Fc-EPO белки, адаптировали к условиям роста на среде, не содержащей сыворотки, и к условиям, приемлемым для крупномасштабного получения, то есть для супензионных условий. Fc-EPO белки, полученные из клеток BHK, выращенных в среде, не содержащей сыворотки, а также в супензии, 15 анализировали с помощью IEF гель-электрофореза так, как описано выше. Эти изменения в ростовых условиях приводили к сдвигам не более, чем только от 0,1 до 0,3 единиц pH в изоэлектрической точке наиболее интенсивной полосы.

20 Образцы Fc-EPO слитых белков, синтезированных в дополненной среде DMEM/F-12, не содержащей белка, подобно этому были охарактеризованы с помощью IEF гель-электрофореза. Было обнаружено, что белковый продукт был 25 сиалирирован в большей степени и демонстрировал более гомогенное сиалирирование, чем соответствующий продукт, полученный из клеток, выращенных в среде, не содержащей белка, такой, как VP-SFM.

30 Степень сиалирирования Fc-EPO белков, полученных в различных линиях клеток, была также качественно подтверждена при использовании изучения связывания лектина. Например, Fc-EPO слитые белки сначала разделяли с помощью стандартного SDS гель-электрофореза и подвергали блоттингу, а 35 потом зондировали с помощью модифицированных лектинов, которые узнают определенные остатки углеводов (например, коммерчески доступные от Roche Applied Science, Indianapolis, IN), и связанные лектины визуализировали. 40 Приемлемые лектины включают, но не ограничены, агглютинин *Sambucus nigra* (SNA) или агглютинин *Maackia amurensis* (MAA), которые узнают сиаловые кислоты со специфическими связями, а также агглютинин *Datura stramonium* (DAA), агглютинин арахиса (PNA) и якалин, которые узнают другие участки 45 остатка углевода, такие, как О-гликановое ядро. Основываясь на анализах связывания лектина, могут быть определены уровни сиалирирования Fc-EPO слитых белков, полученных в различных линиях клеток.

50 Пример 6. *In vitro* биологическая активность вариантов Fc-EPO

5 *In vitro* активности различных Fc-EPO белков исследовали в клеточном анализе. Линия клеток TF-1 экспрессирует EPO рецепторы и, соответственно, при определенных условиях культивирования встраивание ею меченного тритием тимицина представляет собой функцию EPO или EPO-подобной белковой активности (HamMerling *и др.*, (1996) *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14: 1455; Kitamura *и др.*, (1989) *J. Cellular Physiol.* 140: 323). В 10 частности, TF-1 клетки в активной log-фазе дважды промывали в среде, не содержащей EPO, и высаживали при концентрации приблизительно 10^4 15 клеток/ячейка в микротитровальные планшеты. Потом клетки инкубировали в среде с титрованными сериями разведений вариантов Fc-EPO в течение 48 часов. 20 0,3 мкКи 3 Н-тимицина прибавляли к ячейкам за 10 часов перед проведением анализа клеточной пролиферации. В качестве контролей клетки TF-1 также инкубировали в присутствии рекомбинантного человеческого EPO и гипергликозилированного аналога EPO Aranesp®. Встраивание радиоактивного тимицина измеряли как общие подсчеты ТСА-осаждения. Как показано в 25 Таблице 2, активности молекул Fcg2h-M1-EPO являются сравнимыми с таковыми для рекомбинантного человеческого EPO.

Некоторые общие выводы могут быть сделаны из этих данных. В 30 соответствии с ранее описанными результатами, EPO, полученный из клеток CHO, имел значение ED50 приблизительно 0,7 нг/мл; таковое включает NTBSC EPO стандарт, EPO, полученный от R&D Systems, и коммерческий Procrit®. 35 Aranesp® является значительно менее активным *in vitro*, по-видимому, это отражает его сниженную кинетику благодаря его повышенному негативному заряду. Подобно этому Fc-EPO, полученный из клеток BHK, был менее 40 активным, чем Fc-EPO, полученный из клеток NS/0, что является последовательным с наблюдением, что Fc-EPO белки, полученные из клеток BHK, являются высоко сиализованными, что, в свою очередь, приводит к повышенному негативному заряду на белках.

45 Таблица 2

Белок	ED50 (нг/мл)	S.D.	N
EPO (NIBSC)	0,77	0,35	22
EPO (R&D Systems)	0,6	0,26	26
EPO (Procrit®)	0,68	0,15	6

Белок	ED50 (нг/мл)	S.D.	N
EPO (Aranesp®)	2,4	0,96	10
Fcg2h-M1-EPO (NS/0)	0,35	0,15	14
Fcg2h-M1-EPO (BHK)	0,94	0,34	5

Пример 7. Фармакокинетический анализ вариантов Fc-EPO

Фармакокинетические профили различных Fc-EPO белков, синтезированных в различных линиях клеток, были охарактеризованы на основе следующих экспериментов *in vivo*. В одном эксперименте, как показано на Фигуре 8, приблизительно 14 мкг Fcg2h(N > Q)-EPO белка, синтезированного в клетках NS/0 и в клетках BHK, вводили внутривенно мышам Swiss-Webster. В различные моменты времени после введения (например, $T = 0, \frac{1}{2}, 1, 2, 4, 8$ и 24 часа после введения) собирали образцы крови и получали сыворотку с помощью центрифугирования. Концентрации Fc-EPO в сыворотке определяли с помощью ELISA при использовании анти-Fc антител. Как показано на Фигуре 8, через 24 часа после введения более чем 10% исходной концентрации в сыворотке Fc-EPO, полученного из клеток BHK, оставалось в сыворотке, в то время как менее чем 0,1% исходной концентрации в сыворотке Fc-EPO, полученного из клеток NS/0, оставалось в сыворотке.

Подобный эксперимент осуществляли с Fcg2h-EPO(NDS) белками, синтезированными в клетках NS/0 и в клетках BHK. Приблизительно 14 мкг Fcg2h-EPO(NDS) белка, синтезированного в клетках NS/0 и в клетках BHK, вводили внутривенно мышам Swiss-Webster. Образцы крови собирали в моменты времени $T = 0, \frac{1}{2}, 1, 2, 4, 8, 24$ и 36 часов после введения, и концентрации Fcg2h-EPO(NDS) в сыворотки измеряли с помощью анти-Fc ELISA. Как показано на Фигуре 9, через 24 часа после введения более чем 10% исходной концентрации в сыворотке Fcg2h-EPO(NDS), полученного из клеток BHK, оставалось в сыворотке, в то время как менее чем 0,1% исходной концентрации в сыворотке Fcg2h-EPO(NDS), полученного из клеток NS/0, оставалось в сыворотке.

Также сравнивали фармакокинетические профили Fcg2h-EPO(NDS), полученного в клетках BHK-21, клетках PERC6 и 293 клетках. В частности, плазмиду, экспрессирующую Fcg2h-Epo(NDS), транзиентно трансфецировали в

клетки BHK, 293 и PERC6. Экспрессированные Fcg2h-Epo(NDS) слитые белки очищали от различных линий клеток и вводили внутривенно мышам Swiss-Webster при концентрации 1,7 микрограмм на мышь. Образцы крови брали через 5 T = 0, ½, 1, 2, 4, 8, 24, 48 и 72 часа после введения, а концентрацию Fcg2h-EPO(NDS) в сыворотки измеряли с помощью анти-Fc ELISA. Как показано на 10 Фигуре 10, через 24 часа после введения более чем 10% исходной концентрации в сыворотке Fcg2h-EPO(NDS), полученного из клеток BHK, оставалось в сыворотке, в то время как менее чем 1% исходной концентрации в сыворотке Fcg2h-EPO(NDS), полученного из клеток 293, оставалось в сыворотке, Fcg2h-EPO(NDS), полученный из клеток PerC6, почти не определялся в сыворотке. 15 Подобные результаты были получены с Fcg2h(N → Q)-EPO белками, полученными в клетках BHK, PerC6 и 293.

Подобные эксперименты были проведены на мышах для сравнения 20 фармакокинетических профилей Fcg2h(N → Q)-EPO, Fcg2h-EPO(NDS), Fcg2h-EPO, и Aranesp® (то есть NESP). Варианты Fc-EPO, использованные в этих экспериментах, были синтезированы в клетках BHK. При этом наблюдали, что 25 через 48 часов после введения менее чем 10% исходной концентрации в сыворотке Aranesp® оставалось в сыворотке, в то время как более чем 10% исходных концентраций в сыворотке Fcg2h(N → Q)-EPO, а также Fcg2h-EPO(NDS), оставалось в сыворотке. Эти результаты показывают, что Fcg2h(N → 30 Q)-EPO и Fcg2h-EPO(NDS) белки, полученные из клеток BHK-21, имеют значительно более длительный период полураспада в сыворотке крови, чем таковой для Aranesp®.

35 Пример 8. In vivo эффективность вариантов Fc-EPO

In vivo биологические активности вариантов Fc-EPO измеряли с помощью анализов гематокрита (HCT) и анализа ретикулоцитов у мышей и крыс.

40 В одном HCT эксперименте CD1 мышам интраперитонеально вводили Fcg2h(FN → AQ)-EPO белки, синтезированные в клетках BHK, в дозе 20 мкг/кг и 10 мкг/кг. Образцы крови брали от мышей в дни 4, 7, 11 и 14 и центрифугировали 45 в капиллярных трубках. Количество осажденных RBC измеряли как фракции общего объема. Как проиллюстрировано на Фигуре 4, в ответ на инъекцию Fcg2h(FN > AQ)-EPO белков гематокриты сначала значительно повышались, потом оставались на постоянном уровне и, в завершение, снижались.

В другом эксперименте крыс Sprague-Dawley интраперитонеально инъецировали с помощью следующих белков, синтезированных в клетках ВНК. Все животные получали дозировку в размере 42,5 мкг/кг.

- 5 1. Fcg2h-EPO
- 10 2. Fcg2h-EPO(NDS)
3. Fcg4h-EPO
- 15 4. Fcg4h(N > Q)-EPO

15 НСТ анализы осуществляли с образцами крови, взятыми от инъецированных мышей, как описано выше. Как показано на Фигуре 5, в ответ на Fcg2h-EPO(NDS) и Fcg2h-EPO значение гематокрита у инъецированных крыс оставалось постоянным в течение длительного периода времени, что свидетельствовало о том, что как Fcg2h-EPO(NDS), так и Fcg2h-EPO белки, имели длительный период полураспада в сыворотке крови и мощную *in vivo* 20 биологическую активность. Было обнаружено также, что, как показано на Фигуре 5, Fcg4h-EPO и Fcg4h(N → Q)-EPO демонстрировали более короткий 25 постоянный период и более быстрое снижение концентрации в сыворотке крови по сравнению с белками Fcg2h-EPO(NDS) и Fcg2h-EPO.

В другом эксперименте CD1 мышам вводили интраперитонеально следующие образцы.

- 30 1. Fcg2h-EPO(NDS) из клеток ВНК при дозах 85 мкг/кг, 42,5 мкг/кг и 21,25 мкг/кг
- 35 2. Fcg2h-EPO(NDS) из клеток NS/0 при дозах 85 мкг/кг, 42,5 мкг/кг, и 21,25 мкг/кг
3. Aranesp® (т.е. NESP) при дозах 50 мкг/кг, 25 мкг/кг и 12,5 мкг/кг

40 Количество белка подсчитывали на основе молекулярного веса белка без учета углеводов. В этом эксперименте молекулярный вес Fcg2h-EPO(NDS) белка был подсчитан на основе мономерного полипептида.

Соответственно, соотношение молекулярных весов Fcg2h-EPO(NDS) и NESP составляет приблизительно от 1,71 до 1. Таким образом, интервалы доз 45 для каждого белка в этом эксперименте были приблизительно равными.

Как показано на Фигуре 6, Fcg2h-EPO(NDS) белки, синтезированные в клетках ВНК, демонстрировали наилучший профиль в отношении 50 эффективности и длительности эффекта, что свидетельствовало о том, что Fcg2h-EPO(NDS) белки, полученные из клеток ВНК, имели более длительные

5 периоды полураспада в сыворотке крови и более высокую активность *in vivo* по сравнению как с Fcg2h-EPO(NDS), полученным из клеток NS/0, так и с NESP. Профили гематокритов Fcg2h-EPO(NDS), полученных из клеток NS/0 и NESP, являлись сравнимыми.

10 Пример 9. Сравнение Fc-EPO белков с CH2-CH3 доменами, имеющими происхождение от IgG2 и от IgG4

15 Сравнение эритропоэтиновых активностей различных Fc-EPO белков на основе клеточных анализов выявило тот факт, что слитые белки с CH2 и CH3 доменами, имеющими происхождение от IgG4, были в общем случае менее активными, чем соответствующие белки с CH2 и CH3 доменами, имеющими происхождение от IgG2. Этот вывод является справедливым для, по крайней мере, трех типов Fc-EPO белков, а именно белков с NDS мутациями в эритропоэтиновой части и синтезированных в клетках NS/0 (Таблица 3), белков с NDS мутациями, синтезированных в клетках BHK (Таблица 4), и белков, содержащих нормальную эритропоэтиновую часть, синтезированных в клетках BHK (Таблица 5).

20 25 Все белки, которые сравниваются в Таблицах от 3 до 5, приведенных ниже, имеют модифицированный шарнирный участок, имеющий происхождение от IgG1, а также M1 набор мутаций на С-терминальном конце Fc части. Активности белков определяли путем измерения встраивания меченного тритием тимидина в клетки TF-1, стимулированные белками, в соответствии со стандартными 30 35 процедурами, описанными в Примере 6. Активности выражали в ED50 в нанограммах на миллилитр эритропоэтиновых остатков

35 Таблица 3: Клеточные активности Fc-EPO слитых белков с NDS мутациями, которые синтезированы в клетках NS/0

Белки Fc-EPO	ED50(нг ЕРО/мл)	S.D.	№ эксперимента
40 Fcg2h-M1-EPO(NDS) NSO получение 1	0,60	0,17	5
45 Fcg2h-M1-EPO(NDS) NSO получение 2	0,57	0,33	13
50 Fcg2h-M1-EPO(NDS) NSO получение 3	0,54	0,34	8
Fcg2h-M1-EPO(NDS) NSO получение 4	0,36	0,11	5

Белки Fc-EPO	ED50(нг ЕРО/мл)	S.D.	№ эксперимента
Fcg4h-M1-EPO(NDS) NSO получение 1	0,96	0,21	4

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Таблица 4: Клеточные активности Fc-EPO слитых белков с NDS мутациями, которые синтезированы в клетках BHK

Белки Fc-EPO	ED50(нг ЕРО/мл)	S.D.	№ эксперимента
Fcg2h-M1-EPO(NDS) BHK получение 1	0,81	0,23	11
Fcg2h-M1-EPO(NDS) BHK получение 2	2,17	1,23	6
Fcg2h-M1-EPO(NDS) BHK получение 3	1,16	0,28	5
Fcg2h-M1-EPO(NDS) BHK получение 4	0,89	0,44	4
Fcg2h-M1-EPO(NDS) BHK получение 5	1,09	0,41	4
Fcg4h-M1-EPO(NDS) BHK получение 1	6,24	2,34	6

Таблица 5: Клеточные активности Fc-EPO слитых белков с ЕРО дикого типа, которые синтезированы в клетках BHK

Белки Fc-EPO	ED50(нг ЕРО/мл)	S.D.	№ эксперимента
Fcg2h-M1-EPO BHK получение 1	0,84	0,28	4
Fcg2h-M1-EPO BHK получение 2	0,95	0,32	7
Fcg2h-M1-EPO BHK получение 3	0,72	0,27	3
Fcg2h-M1-EPO BHK получение 4	0,95	0,17	3
Fcg2h-M1-EPO BHK получение 5	0,43	0,18	2
Fcg4h-M1-EPO BHK получение 1	1,09	0,31	7
Fcg4h-M1-EPO BHK получение 2	1,53	0,35	6

5 Данные относительно активности *in vitro*, полученные из клеточных анализов, обычно могут предполагать фармакокинетические профили и *in vivo* эффективности белков, содержащих эритропоэтин. Обычно пониженная *in vitro* активность в клеточных анализах отражает сниженную кинетику для ЕРО 10 рецептора, что коррелирует с улучшенными фармакокинетическими свойствами (например, более длительным периодом полураспада) и улучшенной 15 активностью *in vivo*. Однако сниженные активности *in vitro* Fc-ЕРО слитых белков с СН2 и СН3 доменами, имеющими происхождение от IgG4, не коррелируют с улучшенной фармакокинетикой и улучшенной биологической 20 активностью *in vivo*. Было обнаружено, что фармакокинетические профили Fc-ЕРО слитых белков с СН2 и СН3 доменами, имеющими происхождение от IgG4, 25 обычно не различаются от соответствующих белков с СН2 и СН3 доменами, имеющими происхождение от IgG2. Было также обнаружено, что Fc-ЕРО слитые белки с СН2 и СН3 доменами, имеющими происхождение от IgG4, обычно обладают меньшей активностью *in vivo* по сравнению с соответствующими белками с СН2 и СН3 доменами, имеющими происхождение от IgG2 (смотри 30 Фигуру 5).

Пример 10. Влияние устранения сайта гликозилирования в Fc части

30 Эксперименты осуществляли для анализа влияния устранения сайта гликозилирования в Fc части на активность *in vitro*, фармакокинетику и *in vivo* эффективность. В частности, анализировали Fc-ЕРО слитые белки, содержащие либо СН2 и СН3 домены, имеющие происхождение от IgG2, либо СН2 и СН3 35 домены, имеющие происхождение от IgG4. Аспарагин в пределах аминокислотной последовательности Gln-Phe-Asn-Ser IgG2 или IgG4, который соответствовал Asn297 IgG1, заменяли глутамином. В большинстве 40 экспериментов фенилаланин в пределах аминокислотной последовательности Gln-Phe-Asn-Ser заменяли аланином для устранения возможных не принадлежащих Т-клеткам эпитопов, которые могут возникать в результате 45 мутации аспарагина. Как показано в Таблице 6, в клеточных анализах *in vitro* значения ED50 Fc-ЕРО белков с FN > AQ мутацией, устраняющей N-связанный сайт гликозилирования в Fc части, являются обычно приблизительно в пять раз ниже, чем таковые для Fc-ЕРО белков без мутации, что свидетельствует о том, 50

что устранение N-связанного сайта гликозилирования приводит к пониженной эффективности *in vitro* в клеточных анализах.

Эксперименты также осуществляли для анализа эффектов устранения N-связанного гликозилирования на фармакокинетику и на *in vivo* эффективность. CD1 мышей обрабатывали с помощью Fcg2h-M1-EPO, Fcg2h-M1-EPO(NDS) и Fcg2h(N > Q)-M1-EPO белков, синтезированных в клетках BHK, каждый был взят в дозе 42 мкг/кг. При этом наблюдали, что Fcg2h(N → Q)-M1-EPO белок продемонстрировал лучший фармакокинетический профиль, чем соответствующий белок без N → Q мутации. Таким образом, N → Q мутации, которые устраняют N-связанное гликозилирование в Fc части, имеющей происхождение от IgG2, приводят к улучшенной фармакокинетике (например, более длительному периоду полураспада). Более продолжительный период полураспада не может быть объяснен влиянием на связывание с Fc рецепторами, поскольку CH2 и CH3 домены, имеющие происхождение от IgG2, уже обладают существенно неопределенным связыванием с Fc-рецептором.

Таблица 6: Устранение сайтов гликозилирования в Fc части снижает *in vitro* клеточную активность Fc-EPO слитых белков.

Белки Fc-EPO	ED50(нг ЕРО/мл)	S.D.	№ эксперимента
Fcg2h-EPO BHK получение 1	0,84	0,28	4
Fcg2h-EPO BHK получение 2	0,95	0,32	7
Fcg2h-EPO BHK получение 3	0,72	0,27	3
Fcg2h-EPO BHK получение 4	0,95	0,17	3
Fcg2h-EPO BHK получение 5	0,43	0,18	2
Fcg2h(FN > AQ)-EPO BHK получение 1	6,75	2,57	9
Fcg2h(FN > AQ)-EPO BHK получение 2	7,38	1,48	4
Fcg2h(FN > AQ)-EPO BHK получение 3	7,01	4,64	9

	Белки Fc-EPO	ED50(нг ЕПО/мл)	S.D.	№ эксперимента
5	Fcg2h(FN > AQ)-EPO BHK получение 4	3,02	0,88	5
	Fcg2h(FN > AQ)-EPO BHK получение 5	2,77	1,75	5
10	Fcg2h(FN > AQ)-EPO BHK получение 6	5,07	1,64	4
	Fcg2h(FN > AQ)-EPO BHK получение 7	2,53	0,53	5
15	Fcg2h(FN > AQ)-EPO BHK получение 8	2,92	0,52	5
	Fcg2h(FN > AQ)-EPO BHK получение 9	1,55	0,66	5
20	Fcg2h(FN > AQ)-EPO BHK получение 10	2,37	1,78	8
	Fcg4h-M1-EPO BHK получение 1	1,09	0,31	7
25	Fcg4h-M1-EPO BHK получение 2	1,53	0,35	6
	Fcg4h(FN > AQ)-M1-EPO BHK получение 1	17,16		1
30	Fcg4h(FN > AQ)-M1-EPO BHK получение 2	5,87	2,71	7
	Fcg4h(FN > AQ)-M1-EPO BHK получение 3	3,79	0,93	5
35	Fcg4h(FN > AQ)-M1-EPO BHK получение 4	4,78	3,42	8

40 Указанные эффекты являются неожиданными и удивительными, поскольку эти эффекты, которые вызываются устранением N-связанного гликозилирования в Fc частях, имеющих происхождение от IgG2 и IgG4, являются наиболее последовательными с пониженной кинетикой для эритропоэтинового рецептора. 45 Не желая ограничиваться теорией, можно сказать, что устранение N-связанного гликозилирования в Fc частях, имеющих происхождение IgG2 и IgG4, может вызывать полное конформационное изменение в Fc-EPO слитом белке.

50

Пример 11. Лечение гончих собак с помощью Fc-ЕРО слитых белков, синтезированных в клетках ВНК

5 Fc-ЕРО слитые белки вводили гончим собакам для анализа влияния на гематокрит, число ретикулоцитов и другие параметры крови. В частности, Fcg2h(FN → AQ)-ЕРО белки очищали от двух независимо стабильно трансфецированных линий клеток ВНК клона 65 и клона 187 и вводили гончим 10 собакам внутривенно. Одного самца и одну самку гончих собак инъектировали каждым из препаратов в соответствии со следующей схемой:

День 0:	3 микрограмм/кг
День 16:	10 микрограмм/кг
День 23:	100 микрограмм/кг

20 В различные моменты времени после каждого введения брали приблизительно 2 мл крови и измеряли такие параметры крови, как гематокрит, 25 число ретикулоцитов и другие характеристики крови.

Ответы гематокрита после введения показаны на Фигуре 11. После 25 введения дозы 3 мкг/кг Fc-ЕРО слитых белков параметры крови не увеличивались по сравнению с нормальными показателями. Через одну неделю 30 после введения дозы 10 мкг/кг количество ретикулоцитов увеличивалось до 3% от общего объема крови у трех из четырех животных, гематокриты также 35 увеличивались до 51 у одного животного. Другие параметры крови не увеличивались по сравнению с нормальными показателями. После введения дозы 100 мкг/кг значения гематокритов быстро увеличивались, достигая пиковых уровней от 57 до 62 и оставались более высокими по сравнению с 40 нормальными показателями в течение пяти - шести недель. Количество ретикулоцитов оставалось повышенным в течение двух - трех недель.

Для каждого животного число красных клеток крови на микролитр крови и 40 значение гемоглобина, измеренное в граммах на децилитр, были пропорциональными значению гематокрита. Эти результаты свидетельствовали, что Fc-ЕРО белки стимулируют выработку красных клеток крови нормального 45 размера с нормальным содержанием гемоглобина.

Пример 12. Очистка Fc-ЕРО белков для клинического применения

Fc-ЕРО белки очищали в соответствии со стандартными GMP процедурами, 50 известными специалисту в данной области. Клетки ВНК-21 из объединенного клона культивировали в среде DMEM/F-12 (Invitrogen) с добавлением

дополнительно 2,5 мМ L-глутамина (Invitrogen), 2 г/л каждого из HyPep 1501 и HyPep 4601 (Quest International, Chicago, IL), 10 мкл/л этаноламина (Sigma) и 5 мкМ Трополона (Sigma) в течение 7-10 дней в периодической культуре при поддержании высокой жизнеспособности клеток (например, выше 80%). Кондиционную среду собирали и очищали при использовании фильтрации с нормальной скоростью потока, после чего загружали в предварительно 10 уравновешенную Протеин А сефарозную колонку с высокой скоростью истечения (Pharmacia), которая поглощает слитый белок на основе сродства Протеина А к Fc части. Колонку хорошо промывали с помощью натрий 15 фосфатного буфера, взятого в количестве 15 объемов колонки и содержащего 150 мМ фосфата натрия и 100 мМ NaCl при нейтральном значении pH. Связанный белок элюировали при низком значении pH с использованием 20 дополнительных 15 объемов колонки, применяя кислый фосфат натрия, pH 2,5 - 3, который также содержал 150 мМ фосфата натрия и 100 мМ NaCl.

Для инактивации вирусов pH объединенных пиковых фракций доводили до 25 значения 3,8 и инкубировали в течение последующих 30 минут при комнатной температуре. После 30-минутной инкубации объединенные фракции нейтрализовали и стерильно фильтровали, а потом вносили в анионообменную 30 колонку на основе Q-Сефарозы с высокой скоростью истечения (Pharmacia), в которой используется кислое рI Fc-EPO белка как результат высокой степени 35 сиалирования, для эффективного удаления потенциальных загрязняющих веществ совместно элюированных с Fc-EPO белками. В частности, нейтрализованные фракции загружали в анионообменную колонку на основе Q- 40 Сефарозы с высокой скоростью истечения (Pharmacia) при значении pH 5,0 и элюировали с помощью градиента раствора NaCl. Фракции Fc-EPO потом собирали и разделяли на пулы для последующего анализа и для осуществления 45 дополнительного процесса очистки. Например, изъятие высокой концентрации соли из Q-Сефарозной колонки применяли для хроматографической колонки с обратной фазой для удаления избытка NaCl. Разведенный элюант из колонки с обратной фазой в дальнейшем использовали для второй Q-Сефарозной колонки с 50 высокой скоростью истечения (Pharmacia, 3 см X 9 см).

Потенциальные частицы вируса потом удаляли из пула путем нано- 50 фильтрации (например, Viresolve от Millipore). Необязательно можно использовать дополнительные этапы очистки, такие как с применением

5 гидроксиапатитовой колонки или колонки на основе фенилбороната (связывает цис-диолы) В завершение, очищенные белки концентрировали до желаемой концентрации при использовании ультрафильтрации, а потом подвергали диафильтрации в приемлемый буфер для композиции. Материал, в завершение, стерильно фильтровали и заполняли им флаконы до предварительно определенного объема.

10 Пример 13. Стressовый анализ для определения стабильности композиций Fc-EPO белка.

15 Пробирки, содержащие типичный образец композиции Fc-EPO или стандартную композицию Fc-EPO, хранили при температуре 40°C и 75%-ной относительной атмосферной влажности в течение определенного времени хранения (например, 0 недель, 4 недель, 8 недель и т. д.). Из каждого флакона брали аликовоты образцов после определенного периода времени хранения и подвергали их анализу. Образцы оценивали визуально на мутность под прямым освещением с источником люминисцентного излучения. Мутность дополнительно измеряли с помощью измерения абсорбции при длине волны 350 20 нм и 550 нм. В дополнение к этому, состояние Fc-EPO белка в образцах и наличие продуктов разложения белка анализировали с помощью аналитической вытеснительной хроматографии (ВЭЖХ-SEC). Было обнаружено, что 25 композиция, содержащая 0,5 мг/мл Fc-EPO, 10 мМ цитрата pH 6,2, 100 мМ глицина, 100 мМ NaCl, 0,01% вес./об. полисорбата 20 имела значительно 30 повышенную стабильность по сравнению со стандартным раствором.

35 Пример 14 Фаза I по изучению Fcg2h(FN > AQ)-M1-EPO слитого белка на человеке

40 Фазу I клинического исследования Fcg2h(FN > AQ)-M1-EPO слитого белка у человека осуществляли так, как описано далее. Фармакокинетические параметры определяли существенно так, как описано для Aranesp® MacDougall 45 и др. (1999) *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 2392-2395, указанные инструкции введены в данную заявку в качестве ссылки. Конечный период полураспада введенного внутривенно Fcg2h(FN → AQ)-M1-EPO слитого белка (при дозе 1 мкг/кг) у 50 человека, как было установлено, составляет приблизительно от 20 до 30 часов. Таким образом, доза 1 мкг/кг или приблизительно 70 мкг для взрослого пациента, страдающего анемией, приводит к начальной концентрации в сыворотке крови приблизительно 10 нг/мл. Поскольку концентрация

человеческого эритропоэтина человека в норме составляет приблизительно от 0,04 до 0,25 нг/мл (Cazzola *и др.*, (1998) *Blood* 91: 2139-2145), фармакологически активные уровни Fc-ЕРО белка остаются в системе кровообращения человека в течение, по крайней мере, 5-10 дней.

Пример 15. Фаза II исследования по определению дозы и режима дозирования Fcg2h(FN → AQ)-M1-ЕРО слитых белков

Мульцентровое, рандомизированное, последовательное исследование повышения дозы начинали для оценки оптимальной дозы и режима дозирования для Fcg2h(FN > AQ)-M1-ЕРО слитого белка при введении его путем подкожной или внутривенной инъекции пациентам с хронической почечной недостаточностью (CRF), которые подвергались диализу.

В клинической практике в общем случае является приемлемым приспособливать введение Fcg2h(FN → AQ)-M1-ЕРО слитого белка для индивидуального пациента, страдающего анемией, в соответствии со следующим руководством. Вводится начальная доза, после чего параметры крови, такие как гематокрит, гемоглобин, число ретикулоцитов и тромбоцитов, подвергаются мониторингу. Начальная доза типично составляет приблизительно от 0,3 до 3 мкг/кг. Приемлемая начальная доза составляет 1 мкг/кг. Если повышение гематокрита является большим, чем 5-6% от объема крови, через 8 недель терапии, то дозу увеличивают. Если повышение гематокрита приближается к величине 36%, то доза должна быть снижена.

Пример схемы дозирования является следующим.

Дозирование один раз в неделю: 0,075, 0,225, 0,45, 0,75, 1,5 и 4,5 мкг/кг/доза.

Дозирование один раз в две недели: 0,075, 0,225, 0,45, 0,75, 1,5 и 4,5 мкг/кг/доза.

Дозирование один раз в месяц: 0,45, 0,75, 1,5 и 4,5 мкг/кг/доза.

Исследование осуществляли двумя частями. Первая часть представляла собой исследование повышения дозы, предназначенное для оценки дозы Fcg2h(FN → AQ)-M1-ЕРО слитого белка, вводимого либо один раз в неделю, либо один раз в две недели, либо один раз в месяц, которая повышает гемоглобин при оптимальной скорости в течение четырех недель (значение большее или равное 1 г/дл, но меньшее, чем 3 г/дл). Вторая часть каждого исследования была предназначена для определения доз, необходимых (при

введении один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в месяц путем внутривенного или подкожного введения) для поддержания гематокрита на целевом терапевтическом уровне.

5

Формула изобретения

1. Очищенный высоко сиалинированный димерный слитый белок, который существенно состоит из димерной Fc части, содержащей CH2 и CH3 домен IgG2 человека, шарнирный участок IgG человека, и человеческого эритропоэтина (EPO), где каждая цепь димерной Fc части является связанный посредством своего С-терминального конца непосредственно или с помощью линкерного пептида с N-терминальным концом молекулы EPO, при этом слитый белок обладает следующими свойствами:

15

- (i) молекула EPO включает 15-28 остатков сиаловой кислоты;
- (ii) участок Gln-Phe-Asn-Ser последовательности заменен Gln-Ala-Gln-Ser в пределах CH2 домена указанного IgG2, и

20

(iii) аминокислотная последовательность участка Leu-Ser-Leu-Ser вблизи С-терминального конца CH3 домена указанного IgG2 заменена Ala-Thr-Ala-Thr.

2. Димерный Fc-EPO слитый белок по п.1, в котором дополнительно С-терминальный остаток Lys CH3 домена заменен Ala.

25

3. Димерный Fc-EPO слитый белок по п.1, в котором шарнирный участок имеет происхождение от IgG1 человека.

25

4. Димерный Fc-EPO слитый белок по п.3, в котором указанный шарнирный участок IgG1 является модифицированным путем замены аминокислотного остатка Cys в пределах последовательности Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Lys шарнирного участка остатком Ser, образуя, таким образом, последовательность Pro-Lys-Ser-Ser-Asp-Lys в пределах шарнирного участка.

35

5. Димерный Fc-EPO слитый белок по п.1, в котором эритропоэтиновая часть включает, по крайней мере, одну из следующих аминокислотных замен:

- (i) остаток, отличный от цистеина, в положении 29 молекулы EPO,
- (ii) остаток, отличный от цистеина, в положении 33 молекулы EPO,
- (iii) остаток цистеина в положении 88 молекулы EPO и
- (iv) остаток цистеина в положении 139 молекулы EPO.

40

6. Димерный Fc-EPO слитый белок по п.5, в котором аминокислотный остаток, отличный от Cys, находится в положении 33 молекулы EPO вместо исходного остатка Cys, а остаток Cys находится в положении 88 молекулы EPO вместо исходного остатка Trp, что позволяет, таким образом, EPO части в пределах слитого белка образовывать Cys₂₉-Cys₈₈ дисульфидную связь.

45

7. Димерный Fc-EPO слитый белок по п.6, в котором аминокислотный остаток, отличный от Cys, находящийся в положении 33, представляет собой Pro.

50

8. Димерный Fc-EPO слитый белок по п.1, в котором EPO часть включает одну или более мутаций, выбранных из группы:

- (i) Arg₁₃₁ → Glu₁₃₁
- (ii) Arg₁₃₉ → Glu₁₃₉
- (iii) His₃₂ → Gly₃₂
- (iv) Ser₃₄ → Arg₃₄
- (v) Pro₉₀ → Ala₉₀.

9. Димерный Fc-EPO слитый белок по п.1, в котором линкерный пептид включает сайт гликозилирования.

10. Димерный Fc-EPO слитый белок по п.9, в котором сайт гликозилирования включает аминокислотную последовательность Asn-Ala-Thr.

11. Димерный Fc-EPO слитый белок по п.1, в котором полная молекула IgG, включая шарнирный участок, имеет происхождение от IgG2.

12. Димерный Fc-EPO слитый белок по п.1, который дополнительно включает CH1 домен.

13. Димерный Fc-EPO слитый белок по п.1, в котором слитый белок содержит 20-22 остатка сиаловой кислоты.

14. Димерный Fc-EPO слитый белок по п.1, включающий последовательность: EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLPPPDKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQAQSTPRWSVLTWHQDWLNGKEYKCKVSN 15 KGLPAPIEKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPE3STNYKTPPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSATATPGAAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENI 20 TVPDVKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPL QLHVDKAVSGLRSLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYS NFLRGKLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO: 14).

15. Димерный Fc-EPO слитый белок по п.1, включающий последовательность: EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLPPPDKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQAQSTFRWSVLTWHQDWLNGKEYKCKVSN 25 KGLPAPIEKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSATATPGAAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEGPSLNENITV PDTVKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLWSSQPCEALQL HVDKAVSGLRSLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNF 30 LRGKLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO: 15).

16. Молекула ДНК, кодирующая слитый белок по п.1.

17. Фармацевтическая композиция, приемлемая для лечения расстройств гематопоэза или гематопоэтической недостаточности у млекопитающего, включающая эффективное количество Fc-EPO слитого белка, охарактеризованного в п.1, необязательно вместе с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или наполнителем.

18. Популяция очищенных высоко сиалированных Fc-EPO слитых белков по п.1, приемлемых для введения млекопитающему, которую получают путем введения молекулы ДНК, кодирующей соответствующий Fc-EPO слитый белок, в клетку ВНК, экспрессии, изоляции и очистки популяции соответствующих Fc-EPO слитых белков, где указанная популяция имеет более длительный период полураспада в сыворотке крови по сравнению с популяцией соответствующих Fc-EPO слитых белков, синтезированных в клетках NS/0, PerC6 или 293.

19. Популяция очищенных Fc-EPO слитых белков по п.18, где указанная популяция слитых белков содержит в среднем 20-22 остатков сиаловой кислоты на очищенный Fc-EPO слитый белок.

20. Популяция очищенных Fc-EPO слитых белков по п.18 или 19, где ВНК клетка является адаптированной для роста в среде, не содержащей белка, или в супензии.

21. Способ получения популяции высоко сиалированных очищенных рекомбинантных Fc-EPO слитых белков по п.1, причем указанный способ включает

следующие этапы:

- (i) конструирование молекулы ДНК, кодирующей соответствующий Fc-ЕРО слитый белок;
- 5 (ii) трансформацию ВНК клетки с помощью указанной молекулы ДНК в среде, не содержащей белка, или в супензии;
- (iii) экспрессию популяции Fc-слитых белков, кодируемых указанной молекулой ДНК,
- (iv) сбор, изоляцию и очистку указанной популяции Fc-ЕРО слитых белков.

10 22. Способ по п.21, в котором указанная синтезированная популяция слитых белков содержит в среднем 15-28 остатков сиаловой кислоты на очищенный Fc-ЕРО слитый белок.

15 23. Способ по п.21, в котором указанная синтезированная популяция слитых белков содержит в среднем 20-22 остатков сиаловой кислоты на очищенный Fc-ЕРО слитый белок.

20

25

30

35

40

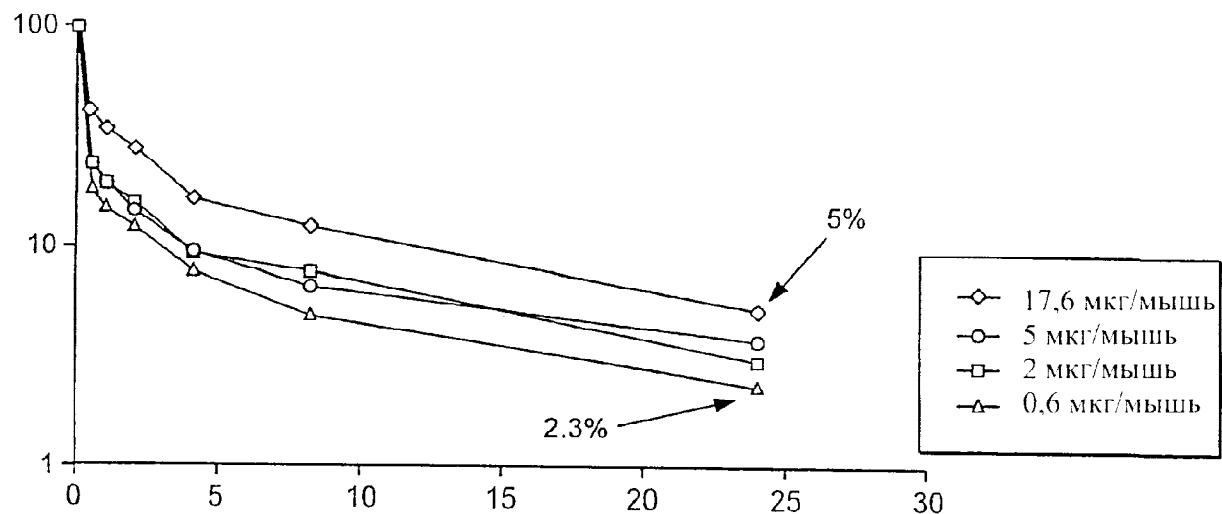
45

50

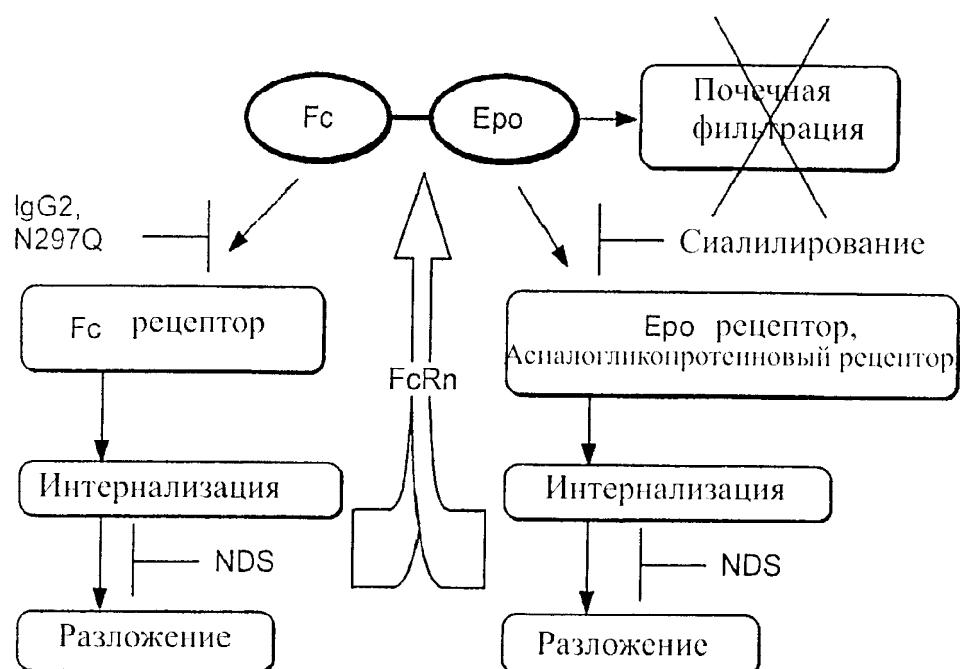
Фиг. 1А

	250	260	270	280	
241	F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D				GC1/118
237	F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D				GC2/118
238	F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D				GC4/118
	290	300	310	320	
281	G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K				GC1/118
277	G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K				GC2/118
278	G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K				GC4/118
	330	340	350	360	
321	C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K				GC1/118
317	C K V S N K G L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K				GC2/118
318	C K V S N K G L P S S I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K				GC4/118
	370	380	390	400	
361	N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S				GC1/118
357	N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S				GC2/118
358	N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S				GC4/118
	370	380	390	400	
401	D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S				GC1/118
397	D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S				GC2/118
398	D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S				GC4/118
	441	L S L S P G K			GC1/118
437	L S L S P G K				GC2/118
438	L S L S L G K				GC4/118

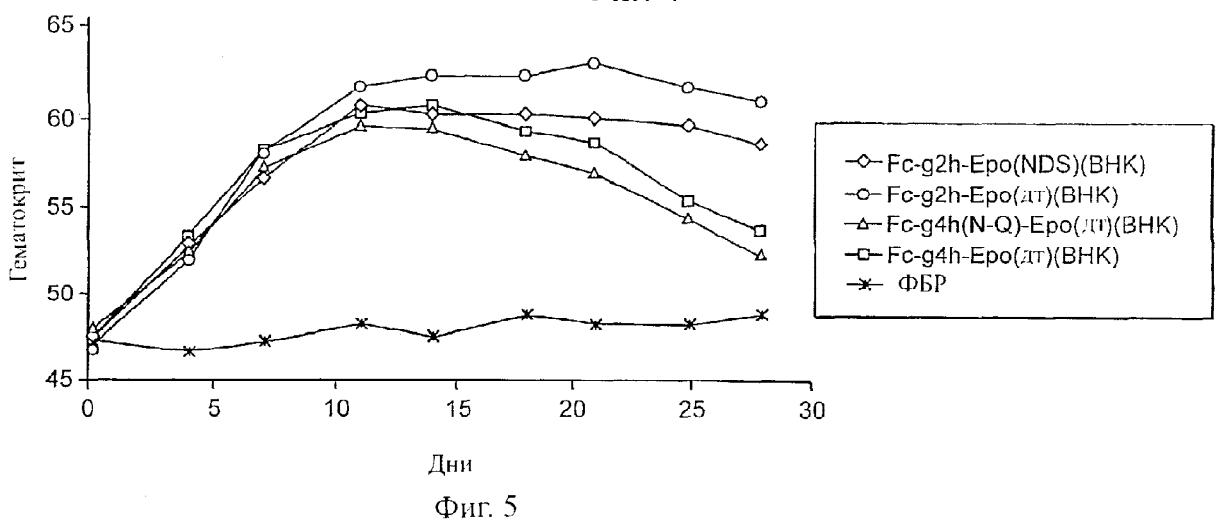
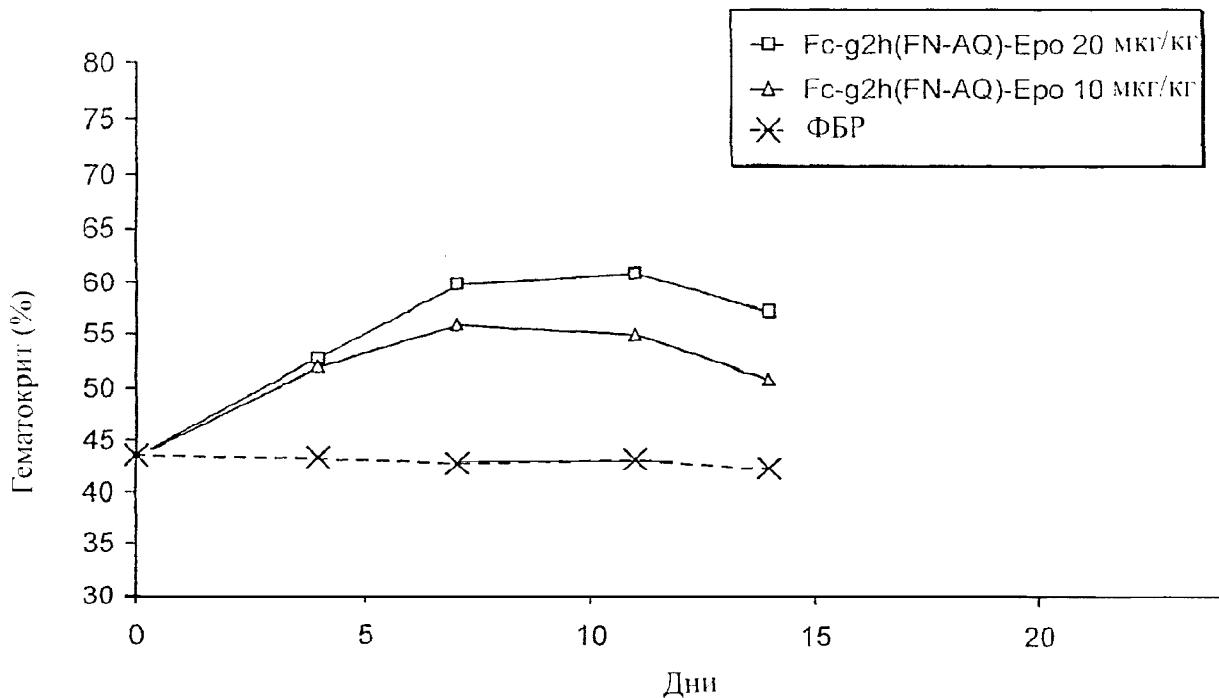
Фиг. IV

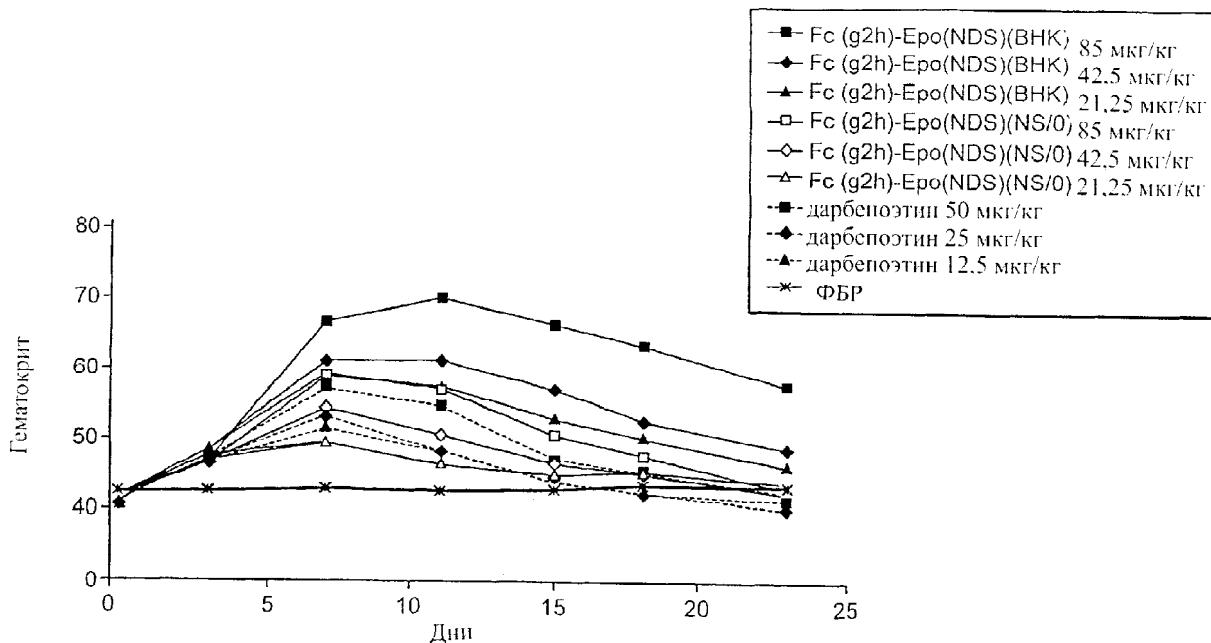


Фиг. 2



Фиг. 3





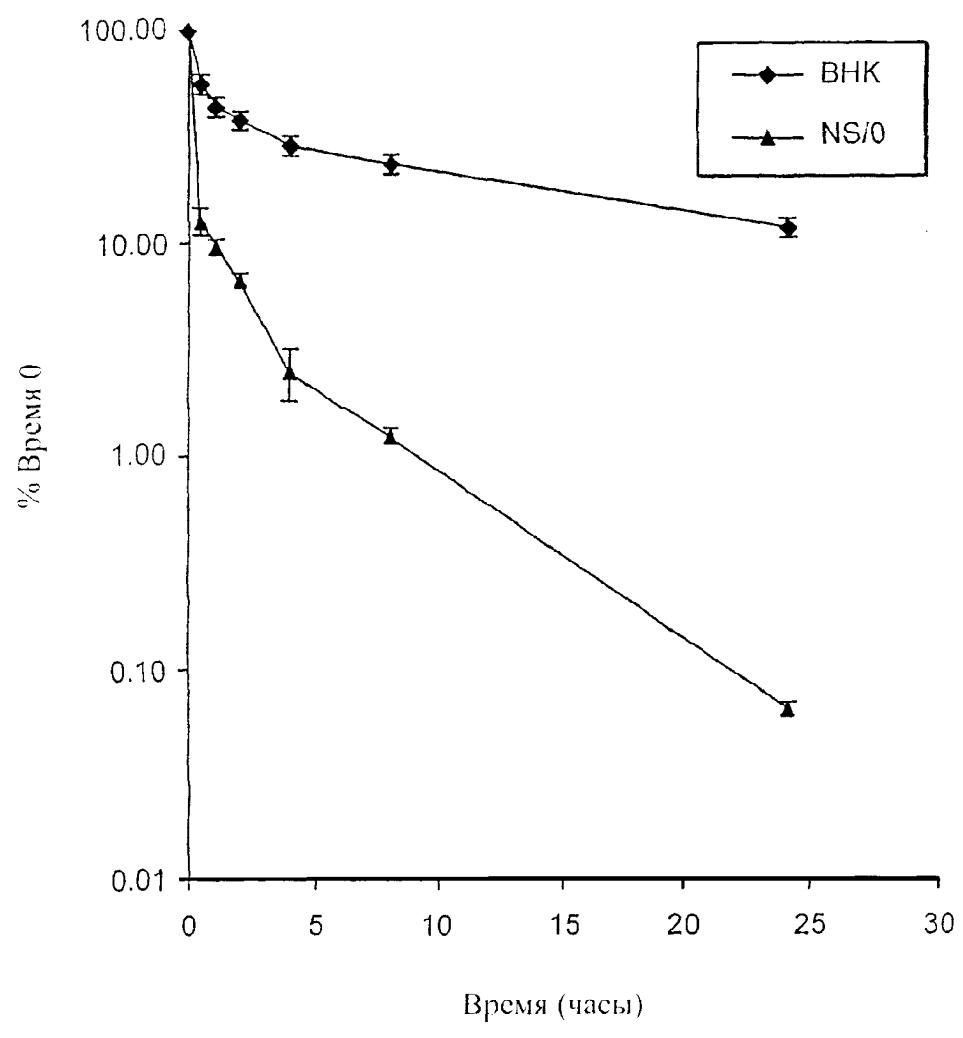
Фиг. 6

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей зрелый huFc-EPO:

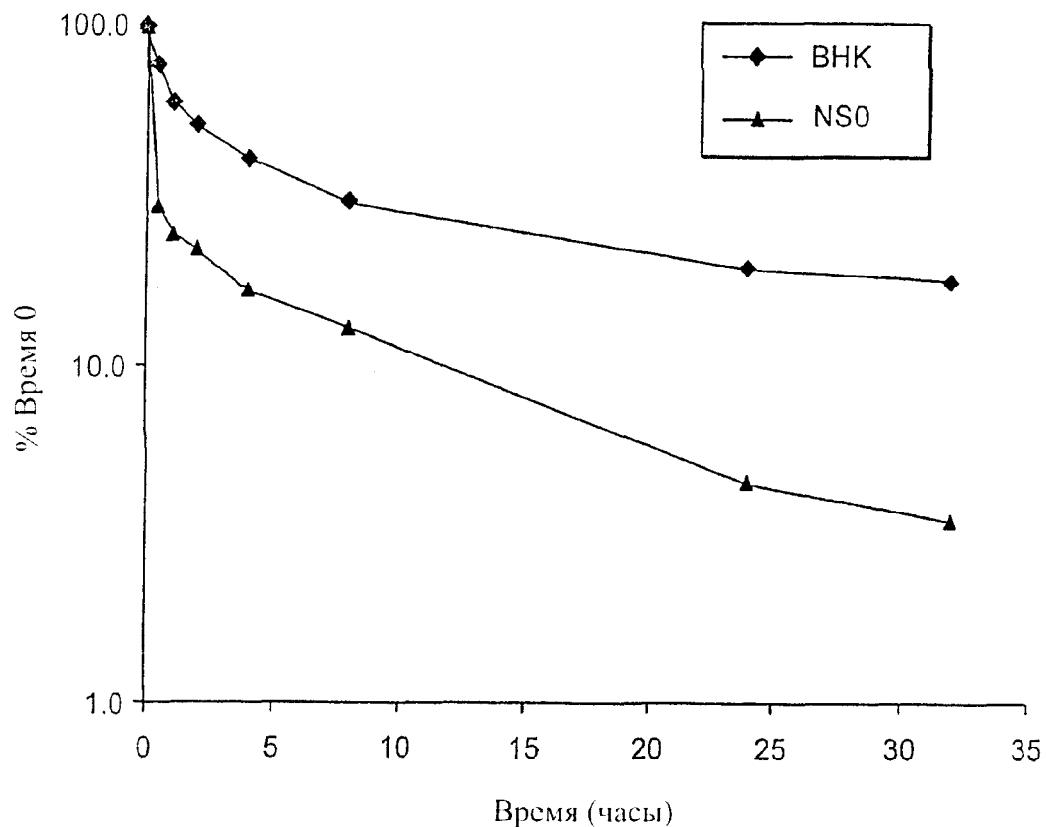
huFc-g2h(FN>AQ)-M1-EPO

GAGCCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGGTAAGCCAGCCCAGGCCTGCCCTC
 CAGCTCAAGGCAGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGGCTGCATCCAGGGACAGGCCAGCTGGGTGCTGACACG
 TCCACCTCCATCTCTCCTCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTCCCTCTTCCCCCAAACCCAA
 GGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCACGGGAGGAGCAG
 AGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCACGGGAGGAGCAG
 GCCCAGAGCACGTTCCGTGGTCAGCGTCTCACCGTTGTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTA
 CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGTGGGA
 CCCGGGGGTATGAGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTGGCCACCCCTCTGCCCTGGGAGTGACCGCTGT
 GCCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCCCTGCCCTCATCGGGAGGAGA
 TGACCAAGAACCAAGGTACGCCGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCTGCCGACATGCCGTGGAGTGG
 GAGAGCAATGGGAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCACACCTCCATGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTT
 CCTCTACAGCAAGCTACCCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCTCATGCTCGTGTGATGC
 ATGAGGCTCTGCACAAACCAACTACACCGAGAAGAGCGCCACCGCGACCCGGCCGCCGCCCCACCGCCTC
 ATCTGTGACAGCCGAGTGCTGGAGAGGTACCTCTGGAGGCCAGGAGGCCAGAATATCACGACCGGCTG
 TGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAACATCACCGTGCCTGACACCAAAGTGAATTCTATGCCTGGAAGA
 GGATGGAGGTTGCCAGCAGGCCGTAGAAGTGTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTCGGAAGCTGTCCTGCGG
 GCCAGGCCCTGTTGGTCAACTCTCCAGCCGTGGAGGCCCTGCAACTGCACTGTGGATAAGCCGTGAG
 TGGCCTCGCAGCCTACCCACTCTGCTCGGGCTCTGGGAGCCCAGAAGGAAGCCATCTCCCTCCAGATG
 CGGCCTCAGCTGCTCCCTCCGACAATCACTGCTGACACTTCCGAAACTCTCCGAGTCTACTCCAAAT
 TTCCCTCGGGAAAGCTGAAGCTGTACACAGGGAGGCCGACAGGGACAGAGATGA

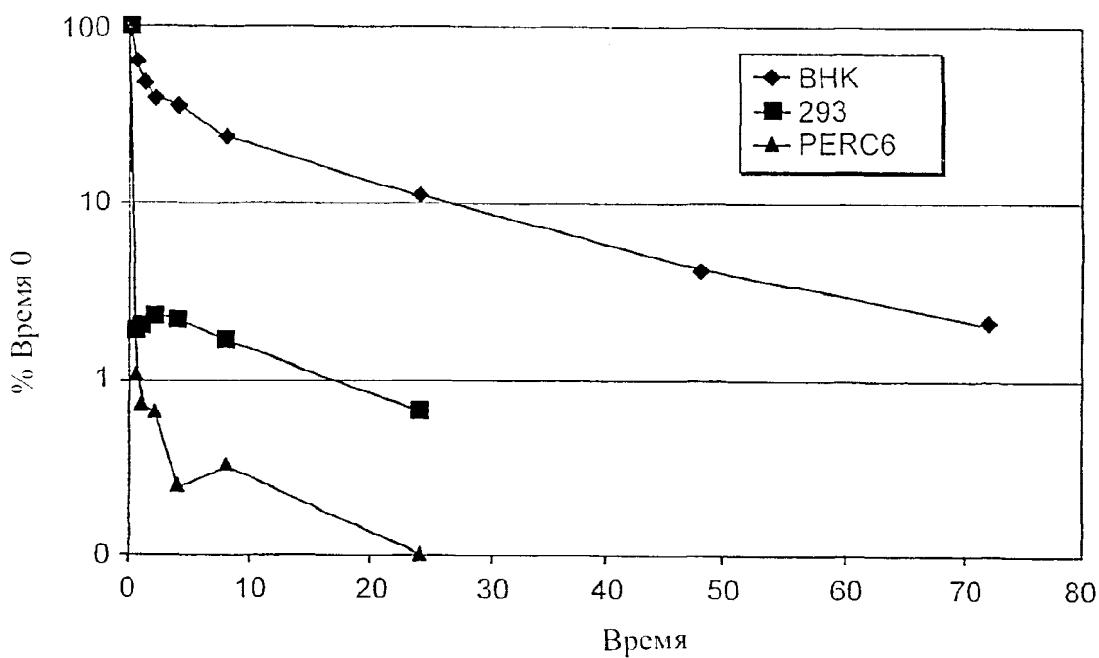
Фиг. 7



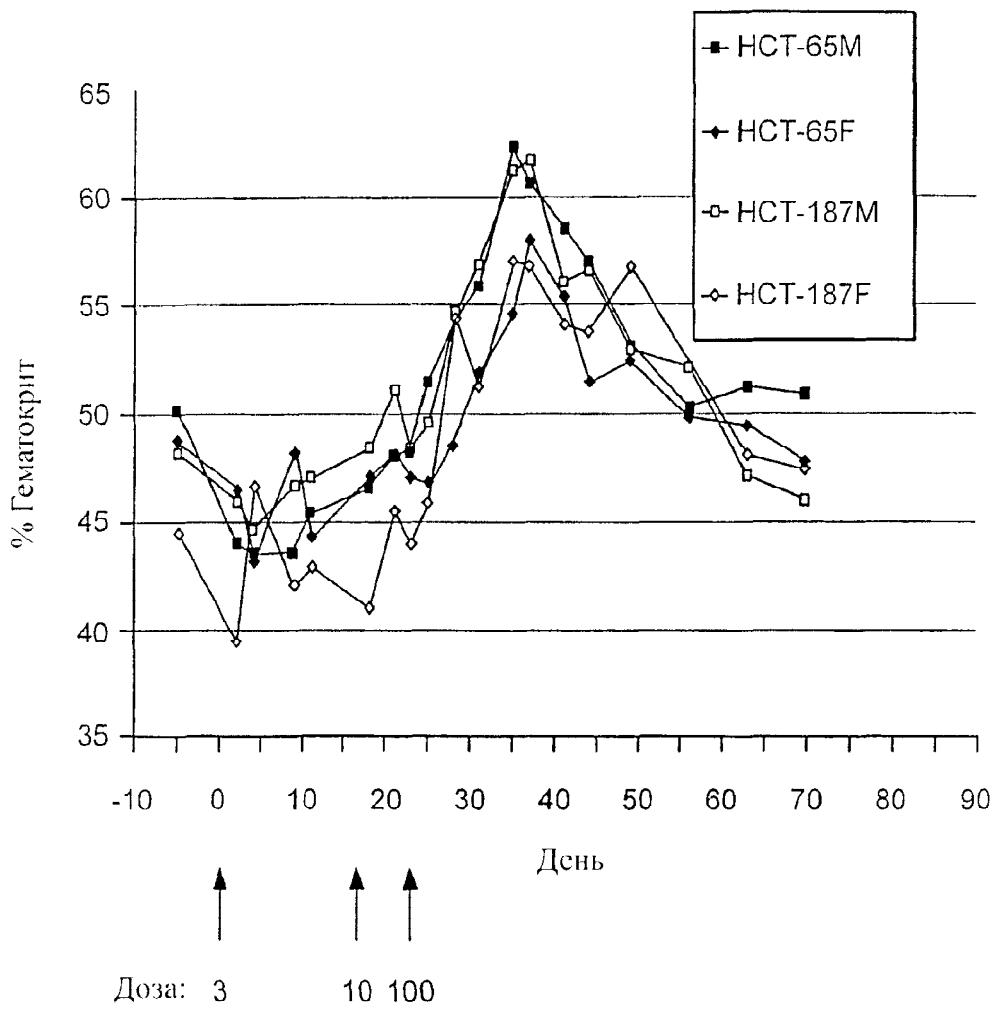
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11